

REC'D 06 NOV 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0072536
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 10월 17일
Date of Application OCT 17, 2003

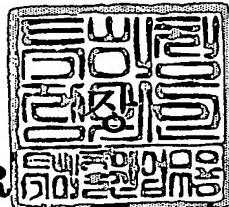
출 원 인 : 주식회사 오스코텍 외 1명
Applicant(s) OSCOTEC INC., et al.



2003 년 10 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.17
【발명의 명칭】	골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 퓨란 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성을
【발명의 영문명칭】	FURAN DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM TO PREVENT AND CURE OSTEOPOROSIS
【출원인】	
【명칭】	주식회사 오스코텍
【출원인코드】	1-1999-036103-0
【대리인】	
【명칭】	한국화학연구원
【출원인코드】	3-1998-007765-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이원희
【성명의 영문표기】	KIM, Jung-Keun
【주민등록번호】	9-1998-000385-9
【우편번호】	1999-039559-1
【포괄위임등록번호】	1999-011676-9
【주소】	경기도 성남시 분당구 서현동 효자촌 현대아파트 114-302
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김세원
【성명의 영문표기】	KIM, Se-Won
【주민등록번호】	580604-1267810
【우편번호】	330-090
【주소】	충청남도 천안시 쌍용동 월봉 현대아파트 503-102호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 오귀옥
【성명의 영문표기】 OH,Kwi-Ok
【주민등록번호】 540102-2009826
【우편번호】 465-150
【주소】 경기도 하남시 망월동 350
【국적】 KR

【발명자】

【성명】 고선일
【출원인코드】 4-1999-057486-3

【발명자】

【성명】 김종여
【출원인코드】 4-1999-054584-3

【발명자】

【성명의 국문표기】 이병의
【성명의 영문표기】 LEE,Byung-Eui
【주민등록번호】 621104-1457211
【우편번호】 306-782
【주소】 대전광역시 대덕구 신탄진동 라이프 새여울아파트 102-106
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김범태
【성명의 영문표기】 KIM,Bum Tae
【주민등록번호】 551230-1006416
【우편번호】 305-761
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 102-505호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이연수
【성명의 영문표기】 LEE,Yeon Soo
【주민등록번호】 570726-1023322

【우편번호】	306-100		
【주소】	대전광역시 대덕구 와동 현대아파트 103-704		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	민용기		
【성명의 영문표기】	MIN, Yong Ki		
【주민등록번호】	600722-1402821		
【우편번호】	302-280		
【주소】	대전광역시 서구 월평동 누리아파트 109-804호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	박노균		
【성명의 영문표기】	PARK, No Kyun		
【주민등록번호】	610221-1409012		
【우편번호】	302-825		
【주소】	대전광역시 서구 도마2동 193 경남아파트 111-302호		
【국적】	KR		
【우선권주장】			
【출원국명】	KR		
【출원종류】	특허		
【출원번호】	10-2002-0064670		
【출원일자】	2002. 10. 22		
【증명서류】	첨부		
【심사청구】	청구		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	49	면	49,000 원
【우선권주장료】	1	건	26,000 원
【심사청구료】	5	항	269,000 원

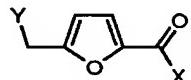
1020 2536

출력 일자: 2003/10/29

【합계】	373,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	199,500 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 퓨란 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 하기 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체는 종래 골다공증 치료제에 비해 골 증식 효과가 우수할 뿐만 아니라 부작용이 적어 골질환 예방 및 치료를 위한 의약품 또는 기능성 식품으로 사용할 수 있다.

화학식 1

(상기 식에서, X 및 Y는 하기 명세서에서 정의한 바와 같다.)

【대표도】

도 1

【색인어】

골다공증, 퓨란, 글루코스

【명세서】**【발명의 명칭】**

골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 퓨란 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물{FURAN DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM TO PREVENT AND CURE OSTEOPOROSIS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 여러 농도로 조골세포주 MG63 세포에 처리하였을 때 세포가 증식된 정도를 화합물 1을 처리하지 않은 대조군에 비교하여 나타낸 그래프이며,

도 2는 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 HOS 세포에 처리하였을 때 염기성 인산분해효소 (ALP)의 활성을 화합물 1을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이며,

도 3은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 6xOSE2-Luc vector를 삽입한 C2C12세포에 처리하였을 때 분화를 위한 전사인자 (Runx2)의 발현을 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이며,

도 4는 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 조골세포주 MG63 세포에 처리하였을 때 OPG 단백질의 발현을 ELISA로 분석한 그래프이며,

도 5는 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 파골세포의 전구세포에 처리하였을 때 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 양성 다핵세포의 생성을 나타낸 그래프이며,

도 6은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 칼슘과 포스페이트로 피막된 플레이트에서 배양한 파골세포의 전구세포에 처리하였을 때 흡수와(resorption pit)의 면적을 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이며,

도 7은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서에 4주간 경구로 10 mg/day를 투여한 실험군에서 대조군에 비해 해면골의 골소주가 소실되지 않은 양상을 보이는 현미경 사진(>2.5)이며,

(a) 화합물 1을 투여하지 않은 백서의 다리뼈 단면

(b) 화합물 1을 투여한 백서의 다리뼈 단면

도 8은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서에 4주간 경구로 10 mg/day를 투여한 실험군에서 대조군에 비해 해면골의 골소주가 소실되지 않은 양상을 보이는 현미경 사진(>40)이며,

(a) 화합물 1을 투여하지 않은 백서의 다리뼈 단면

(b) 화합물 1을 투여한 백서의 다리뼈 단면

도 9는 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서에 4주간 피하로 10 mg을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 해면골의 골소주가 소실되지 않은 양상을 보이는 현미경 사진(>40)이며,

(a) 화합물 1을 투여하지 않은 백서의 다리뼈 단면

(b) 화합물 1을 투여한 백서의 다리뼈 단면

도 10은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서를 4주간 고형사료로 사육하여 골다공증을 유발시킨 후 4주간 경구로 220 $\mu\text{l}/\text{day}$ 를 투여하여 치료효과를 알아본 실험군에서 대조군에 비해 해면골의 골소주가 소실되지 않은 양상을 보이는 현미경 사진(>40)이며,

(a) 화합물 1을 투여하지 않은 백서의 다리뼈 단면

(b) 화합물 1을 투여한 백서의 다리뼈 단면

도 11은 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서에 4주간 경구로 10 mg/day을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 골밀도가 현저히 높으며, 4주째에는 난소절제하기 전보다 골밀도가 증가하는 양상을 보이는 골밀도 (Bone mineral density, BMD) 그래프이며,

도 12는 본 발명의 실시예 1의 화합물 1을 난소절제한 백서를 4주간 고형사료로 사용하여 골다공증을 유발시킨 후 4주간 경구로 220 $\mu\text{l}/\text{day}$ 를 투여하여 치료효과를 알아본 실험군에서 대조군에 비하여 골밀도가 떨어지는 정도가 미약하며 골밀도가 유지되는 양상을 보이는 그레프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <21> 본 발명은 퓨란 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 종래 골다공증 치료제에 비해 골 증식 효과가 우수한 퓨란 유도체 및 그의 약학적으로 허용되는 염 및 상기 유도체를 유효성분으로 하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- <22> 골다공증은 골 조직의 물리적 강도를 결정하는 칼슘의 여러 가지 이유 (유전적 요인, 영양섭취, 호르몬의 변화, 운동, 생활습관)로 감소되어 골수강이 넓어지는 상태로 약한 충격에도 골절이 일어나는 결과를 초래하여 삶의 질을 현저히 저하시키는 증상이다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골밀도가 지속적으로 감소되며, 폐경기에 이르면 호르몬인 에스트로겐이 급격히 감소하여 인터루킨-7에 의한 것처럼 B-임파구가 다량 생성되어 골수에 B세포 전구체가 축

적되고 이로인해 인터루킨-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시켜 골밀도가 감소하게 된다.

<23> 현재 골다공증 치료제로 비스포스포네이트 제제 (알렌드로네이트, 에티드로네이트), 호르몬 제제 (랄록시펜), 비타민 D제제, 칼시토닌 제제, 칼슘제제 등이 있다. 그러나, 비스포스포네이트 제제는 흡수율이 떨어지며 복용방법이 까다롭고 복용방법이 나쁘면 식도염을 유발시키는 단점이 있으며, 호르몬제제는 평생 복용하여야 하며 유방암 및 자궁암 발생율을 증가시킨다. 비타민 D제제는 고가이며 효과가 확실하지 않고, 칼시토닌 제제는 고가이며 투여방법이 어렵고, 칼슘제제는 부작용은 적지만 치료보다는 예방효과에 국한된다.

<24> 구체적으로 종래 골다공증 치료제의 적용상의 문제점 (의약정보 Vol.24, No.10 1998)을 살펴보면 비스포스네이트는 미국 FDA에서 95년 11월 승인된 골다공증 치료제로 강력하게 골흡수를 억제하여 폐경후 골다공증에 효과가 뛰어나지만, 식전 30분~1시간 전에 복용해야 하며, 흡수율이 낮다. 칼시토닌은 골흡수 효과와 시상하부에 작용하여 골절에 따른 통증개선 효과가 뛰어나지만, 효과에 비해 가격이 비싸고 장기 사용할 때 효과가 미약하고 사용방법이 복잡하다. 또한 성호르몬은 골다공증 치료보다는 갱년기 증상과 심혈관 질환의 예방에 주로 사용되고 있으며, 파골세포의 활동을 억제하여 골다공증 치료효과가 좋으나 유방암, 출혈 등 부작용 발생위험과 환자들의 편리성이 떨어지며, 칼슘제는 단순히 성장기/청소년기/임신수유기에 골격형성에 도움이 된다.

<25> 이에, 본 발명자들은 종래 골다공증 치료제의 단점을 개선하기 위하여 연구한 결과, 퓨란 유도체가 종래 골다공증 치료제에 비해 골 증식 효과가 우수하며, 부작용이 적음을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<26> 본 발명의 목적은 골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용가능한 그의 염을 제공하는 것이다.

<27> 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 유도체를 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

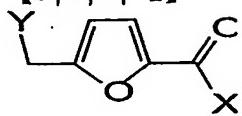
<28> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용가능한 그의 염을 제공한다.

<29> 또한 본 발명은 상기 유도체를 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<30> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<31> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함한다.

<32> 【화학식 1】



<33> (상기 식에서,

<34> X는 H, OH, OR, NR¹R² 이며,<35> Y는 OR, NR¹R², SC(=NH₂)NH이다.

<36> 여기서, R는 수소, 나프탈렌, 또는 메틸, 매톡시, 클로로, 브로모, 요오도, 니트로 및 플로린으로 이루어진 치환기 중에서 3 개 이하의 치환기를 갖는 아릴 또는 4 개 이하의 플로린이 치환된 C₁~C₄의 지방족 알킬기이며,

<37> R¹, R²는 각각 수소, 나프탈렌 또는 메틸, 매톡시, 클로로, 브로모, 요오도, 니트로 및 플로린으로 이루어진 치환기중에서 3 개 이하의 치환기를 갖는 아릴 또는 C₁~C₃의 지방족 알킬기이며, 또는 R¹, R²가 탄소, 산소 또는 수소 혹은 C₁~C₃의 지방족 알킬기를 갖는 질소로 서로 연결된 구조를 갖는 지방족 알킬기이다.)

<38> 상기 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체를 보다 구체적으로 예시하면 하기 표 1~7의 치환기 X 및 Y로 이루어진 퓨란 유도체이다.

<39>

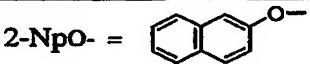
【표 1】

NO	X	Y
1	H	HO-
2	H	CH ₃ COO-
3	H	C ₆ F ₅ O-
4	H	CH ₃ O-
5	H	3, 4-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
6	H	4-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
7	H	2, 4, 6-C ₁ ₃ C ₆ H ₂ O-
8	H	4-BrC ₆ H ₄ O-
9	H	3-CH ₃ -4C ₁ C ₆ H ₃ O-
10	H	C ₆ C ₁ ₅ O-
11	H	4-CNC ₆ H ₄ O-
12	H	3-CF ₃ C ₆ H ₄ O-
13	H	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
14	H	2, 4-F ₂ C ₆ H ₃ O-
15	H	3-BrC ₆ H ₄ O-
16	H	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
17	H	2-BrC ₆ H ₄ O-
18	H	3-C ₁ -4-FC ₆ H ₃ O-
19	H	2-C ₁ -4-BrC ₆ H ₃ O-
20	H	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
21	H	3-CH ₃ -4-NO ₂ C ₆ H ₃ O-
22	H	2-C ₁ -4-FC ₆ H ₃ O-
23	H	2, 3-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
24	H	2-NO ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
25	H	4-C ₁ C ₆ H ₄ O-
26	H	2, 4-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
27	H	2-(CH ₃) ₂ CH-4-C ₁ -5-CH ₃ C ₆ H ₂ O-
28	H	2, 4, 6-Br ₃ C ₆ H ₂ O-
29	H	2-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
30	H	2, 6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-

【표 2】

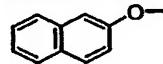
NO	X	Y
31	H	C ₆ H ₅ COO-
32	H	C ₆ H ₅ CH ₂ COO-
33	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-
34	H	2-C1-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
35	H	3-C1-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-
36	H	3-SC ₄ H ₃ CH ₂ COO-
37	H	3-F-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-
38	H	2-NpCH ₂ COO-
39	H	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-
40	H	(C ₆ H ₅) ₃ CCOO-
41	H	2-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
42	H	3-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
43	H	2-BrC ₁₄ H ₂₈ COO-
44	H	C ₁₄ H ₂₉ COO-
45	H	4-FC ₆ H ₄ NHCOO-
46	H	C ₆ H ₅ NHCOO-
47	H	(CH ₃) ₂ CHNHCOO-
48	H	3-CF ₃ C ₆ H ₄ NHCOO-
49	H	3-C1C ₆ H ₄ NHCOO-
50	H	4-BrC ₆ H ₄ NHCOO-
51	H	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NHCOO-
52	H	C ₆ H ₁₁ NHCOO-
53	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCOO-
54	H	3,4-C1 ₂ C ₆ H ₃ NHCOO-
55	H	2-C1C ₆ H ₄ NHCOO-
56	H	CH ₃ CH ₂ NHCOO-
57	H	2-NpNHCOO-
58	CH ₃ O-	3,5-C1 ₂ -4-NH ₂ C ₆ H ₂ C(NH ₂)=NO-
59	CH ₃ O-	2-CH ₃ O-4-CH ₂ =CHCH ₂ C ₆ H ₃ O-
60	CH ₃ O-	2,4-C1 ₂ C ₆ H ₄ O-

【표 3】

NO	X	Y
61	CH ₃ O-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
62	CH ₃ O-	2-BrC ₆ H ₄ O-
63	CH ₃ O-	2,4-C ₁ ₂ C ₆ H ₄ O-
64	CH ₃ O-	2-NpO-
65	CH ₃ O-	C ₆ F ₅ O-
66	CH ₃ O-	2-NO ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
67	CH ₃ O-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
68	CH ₃ O-	2-(CH ₃) ₂ CH-5-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
69	CH ₃ O-	4-C ₁ -C ₆ H ₄ O-
70	CH ₃ O-	3,4-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₃ O-
71	CH ₃ O-	2-C ₁ -4-BrC ₆ H ₃ O-
72	CH ₃ O-	2-C ₁ -4-FC ₆ H ₃ O-
73	CH ₃ O-	3-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
74	CH ₃ O-	2-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
75	CH ₃ O-	3-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
76	CH ₃ O-	2,4-(CH ₃)C ₆ H ₃ O-
77	CH ₃ O-	3,5-(CH ₃) ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₂ O-
78	CH ₃ O-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
79	CH ₃ O-	4-IC ₆ H ₄ O-
80	CH ₃ O-	4-C ₁ C ₆ H ₄ O-
81	CH ₃ O-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
82	CH ₃ O-	HN=C(NH ₂)S-
83	CH ₃ O-	2-NpO-
84	CH ₃ O-	C ₆ F ₅ O-
85	CH ₃ O-	(CH ₃) ₂ N-
86	CH ₃ O-	HN=C(NH ₂)S-
87	CH ₃ O-	(CH ₂) ₅ N-
88	CH ₃ O-	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N-
89	CH ₃ O-	C ₆ H ₅ NH-
90	CH ₃ O-	(CH ₂) ₄ N-
2-NpO- =		

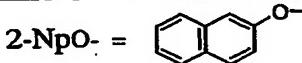
【표 4】

NO	X	Y
91	CH ₃ O-	(CH ₃) ₃ CNH-
92	CF ₃ CH ₂ O-	2-NpO-
93	(CH ₃) ₂ CHO-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
94	(CH ₃) ₂ CHO-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
95	(CH ₃) ₂ CHO-	2,5-C ₁ 2C ₆ H ₃ O-
96	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-	CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ O-
97	4-C ₁ C ₆ H ₄ O-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
98	C ₆ H ₅ O-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
99	CH ₂ =CHCH ₂ O-	2,4-C ₁ 2C ₆ H ₃ O-
100	HO-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
101	HO-	CHF ₂ CF ₂ CH ₂ O-
102	HO-	4-FC ₆ H ₄ O-
103	HO-	4-BrC ₆ H ₄ O-
104	HO-	2-NpO-
105	HO-	3-CF ₃ C ₆ H ₄ C(CH ₃)=NO-
106	HO-	2,4-C ₁ 2C ₆ H ₃ O-
107	HO-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
108	HO-	2-BrC ₆ H ₄ O-
109	HO-	2,5-C ₁ 2C ₆ H ₃ O-
110	HO-	4-FC ₆ H ₄ O-
111	HO-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
112	HO-	3-C ₁ C ₆ H ₄ O-
113	HO-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
114	HO-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
115	HO-	4-C ₁ -2-NO ₂ C ₆ H ₃ O-
116	HO-	3-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
117	HO-	1-NpO-
118	HO-	4-CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)C ₆ H ₄ O-
119	HO-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
120	HO-	C ₆ H ₅ CH ₂ S-

2-NpO- = 

【표 5】

NO	X	Y
121	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
122	3-CH ₃ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
123	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-	4-C1-3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
124	CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₄ O-
125	(CH ₂) ₄ CHNH-	CF ₃ CH ₂ O-
126	(CH ₂) ₆ CHNH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
127	(CH ₃) ₃ CNH-	CF ₃ CH ₂ O-
128	(CH ₂) ₆ N-	2-BrC ₆ H ₄ O-
129	(CH ₃) ₃ CNH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
130	(CH ₃) ₂ CHNH-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-
131	CH ₃ N(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
132	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-
133	(CH ₂) ₆ N-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
134	(CH ₂) ₅ CHNH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
135	(CH ₂) ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
136	C ₆ H ₅ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
137	C ₆ H ₅ NH-	2-NpO-
138	4-C1C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
139	3-F-4-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
140	3-BrC ₆ H ₄ NH-	4-FC ₆ H ₄ O-
141	4-FC ₆ H ₄ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-
142	3-C1-4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-
143	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
144	2-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-C1C ₆ H ₃ O-
145	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
146	4-BrC ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
147	4-FC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
148	4-NH ₂ CO ₆ H ₄ NH-	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
149	2-NO ₂ -4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
150	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-

2-NpO- = 

【표 6】

NO	X	Y
151	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-
152	2-CH ₃ -5-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
153	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
154	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
155	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
156	2,3-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
157	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
158	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
159	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	4-I-C ₆ H ₄ O-
160	4-CH ₃ COOC ₆ H ₄ NH-	1-NpO-
161	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-
162	2-F-4-BrC ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
163	3-CH ₃ CH ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
164	3,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
165	(CH ₃) ₃ CNH-	4-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ O-
166	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
167	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	2,4-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
168	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
169	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ -C ₆ H ₄ O-
170	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
171	2-CH ₃ O-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-
172	2,3-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-
173	4-C1C ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₄ O-
174	2-C1C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
175	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
176	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-CH ₃ O-4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃ O-
177	2-FC ₆ H ₄ NH-	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
178	2-FC ₆ H ₄ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
179	2,6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-

【표 7】

NO	X	Y
180	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	3, 4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
181	2-C1-5-CF ₃ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
182	2-CH ₃ O-4-NO ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
183	2-NO ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-
184	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	CHF ₂ CF ₂ CH ₂ O-
185	2, 4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2, 3, 5, 6-F ₄ C ₆ H ₃ O-
186	3, 4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3, 4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
187	3-CH ₃ CONHC ₆ H ₄ NH-	C ₆ F ₅ O-
188	2, 4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
189	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
190	4-IC ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
191	3-NO ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-

<46> 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체 그리고 약학적으로 허용되는 그의 염 뿐만 아니라, 그로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함한다.

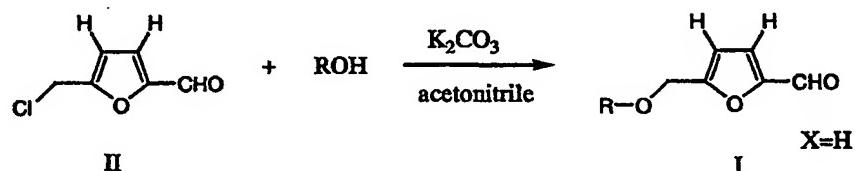
<47> 본 발명의 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속 염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

<48> 본 발명의 퓨란 유도체는 본 분야에서 사용되는 통상적인 추출 및 화학적 합성을 통하여 얻을 수 있으며, 본 발명에서는 그 범위를 한정하지 않는다.

<49> 구체적으로, 본 발명의 퓨란 유도체의 제조방법의 일예를 하기에 기술한다.

<50> (1) 본 발명의 화합물중 X가 -H인 퓨란-2-카르복시알데히드화합물 유도체는 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이 5-클로로메칠퓨란-2-카르복시알데히드를 아세토니트릴 용매에서 탄산칼륨염 기를 이용하여 치환된 지방족 알콜, 치환된 아릴알콜 또는 여러종류의 아민과 반응시켜 5-치환된 메칠 퓨란-2-카르복시알데히드를 제조한다(X가 H, Y가 OH인 경우는 식물인 숙지황(*Rehmannia glutinosa Libosch*)에서 추출하여 생리활성을 검정하였다). 여기서 출발물질로 사용된 화학식 II로 표시되는 5-클로로메칠퓨란-2-카르복시알데히드는 참고문헌 (W.N. Haworth, W. G. M. Jones, *J. Chem. Soc.* 667-670, 1944)에 따라 글루코스와 염산으로부터 제조된다.

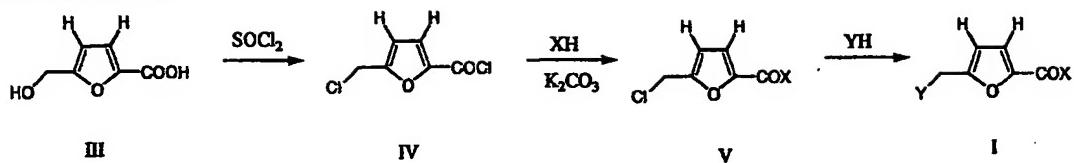
<51> 【반응식 1】



<52> (2) 본 발명의 화합물중 X가 H이 아닌 퓨란-2-카르복실화합물 유도체는 하기 반응식 2에 나타낸 바와 같이 화학식 III으로 표시되는 5-히드록시메칠퓨란-2-카르복실산을 이용하여 화학식 IV로 표시되는 5-클로로메칠 퓨란-2-카르복실클로라이드를 제조하고, 여기에 다양한 알코올 및 아민 유도체와 반응시켜 화학식 V로 표시되는 5-클로로메칠 퓨란-2-카르복실산 에스테르 및 아미드유도체를 제조한다. 5-클로로메칠 퓨란-2-카르복실산 에스테르 및 아미드유도체에 다양한 알코올, 아민, 치오우레아 등 친핵체를 치환시켜 화학식 I로 표시되는 5-치환메칠 퓨란-2-카르복실산 에스테르 및 아미드유도체를 제조한다.

<53> 여기서 출발물질로 사용된 화학구조식 III으로 표시되는 5-히드록시메칠퓨란-2-카르복실산은 참고문헌 (W. N. Haworth, et al, *J. Chem. Soc.* 1513-1526, 1927)에 따라 제조된다.

<54> 【반응식 2】



<55> 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 포함한다.

<56> 본 발명의 퓨란 유도체는 종래 골다공증 치료제에 비해 우수하게 조골세포의 증식을 촉진시키고, 조골세포의 활성을 증진시키며, 파골세포의 증식 및 활성을 억제하는 활성을 나타낸다. 구체적으로 하기 실험예에서 보는 바와 같이, 실시예 1의 화합물을 첨가한 경우, 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 105 %이상의 세포증식 효과를 나타내며(도 1 참조), 인산분해효소의 활성이 120 % 증가하였으며(도 2 참조), 실시예 1의 화합물이 조골세포의 분화를 위한 Runx2의 활성을 촉진시킬 수 있다(도 3 참조). 본 발명의 실시예 1의 화합물은 조골세포에서 파골세포의 생성을 억제하는 물질인 OPG(osteoprotegerin) 단백질의 발현을 증가시키며(도 4 참조), TRAP (+) 다핵세포에 첨가하였을 때 그 수가 현저히 감소되며(도 5 참조), 이로 인해 파골세포의 활성을 억제하는 작용을 나타낸다(도 6 참조). 또한, 동물모델을 이용한 임상조직 실험결과, 골다공증 예방효과 및 치료효과를 나타내었다. 상기 효과를 나타내는 본 발명의 퓨란 유도체로 이루어진 약학적 조성물은 골 증식을 향상시켜 성장기 어린이의 키 성장과 골다공증, 퇴행성 골질환 및 류마티스 관절염과 같은 골질환 등의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<57> 상기 화학식 1의 화합물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 총진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면

활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데,흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 혼탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<58> 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.01~1000 mg/일이며, 바람직하게는 0.1~500 mg/일이며, 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

<59> 또한, 본 발명은 상기 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 하는 기능성 식품, 건강보조 식품 또는 특수영양식품을 제공한다.

- <60> 본 명세서에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 상기 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다.
- <61> 기능성 식품과 구별하여, 본 명세서에서 '건강보조식품' 또는 '특수영양식품'이란, 상기 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 일반식품에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 혼탁액 등으로 제조한 건강식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하였기 때문에 약품의 장기복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.
- <62> 본 발명에 따른 퓨란 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 함유하는 기능성 식품, 건강보조식품 및 특수건강식품의 함량은 사용되는 식품군에 따라 다양하게 변화시킬 수 있으며, 그 함량은 상기 약학적 조성물로의 용도시 측정된 독성 범위내에서 수행한다.
- <63> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <64> <실시예 1> 본 발명의 퓨란 유도체의 제조방법
- <65> (1) 5-히드록시메칠푸란-2-카르복시알데히드(화합물 1)의 제조방법
- <66> 숙지황(*Rehmannia glutinosa* Libosch : 에탄올[주정, 막걸리] 증기로 찐것) 600 g을 추출용 반응기에 증류수 3 ℥를 가하여 95℃ 정도로 열수추출을 2회 반복하였다. 여과후 추출액을 모아서 40℃ 이하에서 감압 농축하였다.

<67> 농축액을 열린 컬럼(open column)에 실리카겔을 충진시키고 에틸아세테이트와 n-헥산을 용매로 크로마토그래피를 실시하여 720 mg을 얻었다(녹는점 32~35°C).

<68> (2) 치환기를 갖는 옥시메칠푸란-2-카르복시알데히드(화합물 2~30)의 제조방법

<69> 5-클로로메칠푸란카르복시알데히드 143 mg (1 mmol), 알코올 화합물 (1-2 mmol), 아세토니트릴 (10 ml) 혼합액에 탄산칼륨 (1 mmol)을 가하고 5시간 상온에서 교반하였다. 반응종결을 박막크로마토그라피로 확인후 용매를 진공증발기에서 제거하였다. 잔사에 에칠아세테이트 (30 ml)와 물 (30 ml)를 가하여 유기층을 분리후 건조 여과하고 관크로마토그라피로 분리하여 치환기를 갖는 옥시메칠푸란-2-카르복시알데히드를 50~70% 수율로 얻었다.

<70> (3) 5-클로로메칠푸란-2-카르보닐산 메틸에스테르 (V, X=OCH₃) 의 제조방법

<71> 5-히드록시메칠푸란카르복실산 (100 mmol), 티오닐클로라이드 (150 mmol), 툴루엔 (100 ml) 혼합액에 디메칠품아미드 (1 ml)를 적가하고 5시간 환류하여 반응을 종결후 상압증류하여 용매와 과량의 치오닐 클로라이드를 제거하여 5-클로로메칠푸란카르보닐클로라이드(IV)를 액체 상태로 얻었다. 여기에 무수 메탄올 (50 ml)을 상온에서 적가하고 탄산칼륨 (200 mmol)을 분말상태로 가하고 1시간 교반하였다. 메탄올을 진공증발기에서 제거하고, 물 (100 ml)과 에칠아세테이트 (100 ml)를 가하고 유기층을 분리하였다. 유기층을 마그네슘 설페이트로 건조하고, 여과한 후 진공증발기에서 유기용매를 제거하였다. 잔사를 관크로마토그라피하여 원하는 5-클로로메칠푸란-2-카르보닐산 메틸에스테르를 70%의 수율로 얻었다.

- <72> (3-1) 5-치환옥시메칠푸란-2-카르보닐산 메틸에스테르(화합물 31~44)의 제조방법
- <73> 5-히드록시메칠푸란카르복시알데하يد (1 mmol), 트리에칠아민 (2 mmol), 아세토니트릴 (10 ml) 혼합액에 아실화합물 (1 mmol)을 가하고 5시간 상온에서 교반하였다. 반응종결을 박막크로마토그라피로 확인후 용매를 진공증발기에서 제거하였다. 잔사에 에칠아세테이트 (10 ml)와 물 (10 ml)를 가하여 유기층을 분리후 건조 여과하고 판크로마토그라피로 분리하여 원하는 물질을 50~70%의 수율로 얻었다.
- <74> (3-2) 5-아미노카르보닐옥시메칠푸란-2-카르복시알데하يد(화합물 45~57)의 제조방법
- <75> 5-히드록시메칠-2-퍼퓨랄 (2 mmol)을 테트라히드로푸란 (5ml)에 용해시키고 질소를 흘린다. 이소시아네이트 유도체 (2.2mmol)를 반응액에 부가하고, 소량의 트리에칠아민 (0.5ml)를 넣고 반응액을 상온에서 3-6 시간 교반시킨 후, 물 (50ml)에 반응액을 부가하고 에칠아세테이트 (25ml × 3)로 유기층을 추출하여 무수. 황산마그네슘으로 유기층을 건조시켰다. 용매를 감압농축하여 얻어진 잔류물을 판크로마토그라피로 정제하여 카바메이트 화합물 (95-98%)을 얻었다.
- <76> (3-3) 5-치환옥시메칠푸란-2-카르보닐산(화합물 100~120)의 제조방법
- <77> 5-클로로메칠푸란카르보닐산 (1 mmol), 알코올 혹은 아민 화합물 (1-2 mmol), 아세토니트릴 (10 ml) 혼합액에 탄산칼륨 (2 mmol)을 가하고 5시간 상온에서 교반한다. 반응종결을 박막크로마토그라피로 확인후 1 몰 염산으로 중화하고 용매를 진공증발기에서 제거한다. 잔사에

에칠아세테이트 (10 ml)와 물 (10 ml)를 가하여 유기층을 분리후 건조 여과하고 판크로마토그라피로 분리하여 원하는 물질을 50-70%의 수율로 얻었다.

<78> (4) 5-클로로메칠퓐란-2-카르보닐산 에스테르, 아미드 (V, X=-OR, -NR)의 제조방법

<79> 5-히드록시메칠퓐란카르복실산 (100 mmol), 치오닐클로라이드 (150 mmol), 툴루엔 (100 ml) 혼합액에 디메칠품아미드 (1 ml)를 적가하고 5시간 환류하여 반응을 종결후 상압증류하여 용매와 과량의 치오닐 클로라이드를 제거하여 5-클로로메칠퓐란카르보닐클로라이드(IV)를 액체상태로 얻는다. 잔사를 툴루엔 (30 ml)에 녹인 용액에 무수 알코올 (110 mmol)을 상온에서 적가하고 탄산칼륨 (110 mmol)을 분말상태로 가하고 1시간 교반한다. 용매를 진공증발기에서 제거하고, 물 (100 ml)과 에칠아세테이트(100 ml)를 가하고 유기층을 분리한다. 유기층을 마그네슘 설페이트로 건조하고, 여과한 후 진공증발기에서 유기용매를 제거한다. 잔사를 판크로마토그라피하여 원하는 5-클로로메칠퓐란-2-카르보닐산 메칠에스테르를 50-70%의 수율로 얻었다.

<80> (4-1) 5-치환옥시메칠퓐란-2-카르보닐산 에스테르, 아미드(화합물 58~191)의 제조방법

<81> 5-클로로메칠퓐란카르보닐산 에스테르 (1 mmol), 알코올 혹은 아민 화합물 (1-2 mmol), 아세토니트릴 (10 ml) 혼합액에 탄산칼륨 (1 mmol)을 가하고 5시간 상온에서 교반한다. 반응종결을 박막크로마토그라피로 확인후 용매를 진공증발기에서 제거한다. 잔사에 에칠아세테이트 (10 ml)와 물 (10 ml)를 가하여 유기층을 분리후 건조 여과하고 판크로마토그라피로 분리하여 원하는 물질을 50-70%의 수율로 얻었다.

<82> 하기에 상기 화합물 1, 31~57에 대한 NMR 데이터 및 질량분석 스펙트럼을 기술하였다.

<83>

화합물 번호	핵자기 공명 스펙트럼 (200 MHz, CDCl ₃ , ppm)
1	3.29 (s, 1H), 4.71 (s, 2H), 6.52 (d, 2H, J=2.1 Hz), 7.23 (d, 2H, J=2.1 Hz), 9.57 (s, 1H).
31	9.66(s, 1H), 8.03-8.08(m, 2H), 7.34-7.62(m, 3H), 7.23(d, J=3.5, 1H), 6.67(d, J=3.4, 1H), 5.38(s, 2H)
32	9.66(s, 1H), 8.03-8.08(m, 2H), 7.34-7.62(m, 3H), 7.23(d, J=3.5, 1H), 6.67(d, J=3.4, 1H), 5.38(s, 2H)
33	9.64(s, 1H), 7.20 - 7.33(m, 1H), 7.21(d, J=3.6, 1H), 6.84-6.96(m, 2H), 6.57(d, J=3.4, 1H), 5.19(s, 2H), 3.77(s, 2H)
34	9.64(s, 1H), 6.97 - 7.26(m, 4H), 6.57(d, J=3.4, 1H), 5.19(s, 2H), 3.89(s, J=1.6, 2H)
35	9.64(s, 1H), 7.12 - 7.32(m, 5H), 6.55(d, J=3.6, 1H), 5.16(s, 2H), 3.65(s, 2H)
36	9.64(s, 1H), 7.19 - 7.26(m, 2H), 6.92-6.96(m, 2H), 6.57(d, J=3.4, 1H), 5.18(s, 2H), 3.89(s, 2H)
37	9.64(s, 1H), 7.23 - 7.34(m, 1H), 7.19(d, J=3.4, 1H), 6.94-7.06(m, 2H), 6.54(d, J=3.4, 1H), 5.16(s, 2H), 3.67(s, 2H)
38	9.63(s, 1H), 7.38 - 7.84(m, 7H), 7.18(d, J=3.6, 1H), 6.54(d, J=3.6, 1H), 5.18(s, 2H), 3.85(s, 2H)
39	9.66(s, 1H), 7.17 - 7.28(m, 1H), 7.20(d, J=3.6, 1H), 6.77-6.90(m, 2H), 6.57(d, J=3.6, 1H), 5.17(s, 2H), 3.69(s, 2H)
40	9.58(s, 1H), 7.11 - 7.29(m, 16H), 6.35(d, J=3.6, 1H), 5.27(s, 2H)
41	9.63(s, 1H), 7.19 - 7.25(m, 2H), 7.20(d, J=3.4, 1H), 6.89-6.91(m, 2H), 6.54(d, J=3.4, 1H), 5.15(s, 2H), 3.77(s, 3H), 3.67(s, 2H),
42	9.63(s, 1H), 7.23 - 7.81(m, 1H), 7.19(d, J=3.6, 1H), 6.80-6.87(m, 3H), 6.53(d, J=3.6, 1H), 5.15(s, 2H), 3.78(s, 3H), 3.64(s, 2H)
43	9.65(s, 1H), 7.22(d, J=3.6, 1H), 6.33(d, J=3.6, 1H), 5.22(s, 2H), 4.27(t, J=7.7, 1H), 2.05(m, 2H), 1.18-1.31(m, 22H), 0.87(t, J=6.3, 3H)
44	??9.64(s, 1H), 7.20(d, J=3.6, 1H), 6.57(d, J=3.4, 1H), 5.12(s, 2H), 2.35(t, J=7.2, 2H), 1.59-1.66(m, 2H), 1.18-1.25(m, 16H), 0.87(t, J=6.7, 3H)
45	9.64(s, 1H), 7.28 - 7.36(m, 2H), 7.23(d, J=3.4, 1H), 6.97-7.05(m, 2H), 6.70(s, 1H), 6.63 (d, J=3.4, 1H), 5.21(s, 2H)
	Mass(m/s(intensity)): 263(M), 248(1), 219(3), 190(10), 137(20), 109(100), 80(38), 53(33)

<84>

화합물 번호	핵자기 공명 스펙트럼 (200 MHz, CDCl ₃ , ppm)
46	9.61(s, 1H), 7.02-7.42(m, 5H), 7.20(d, J=3.5, 1H), 7.19(s, 1H), 6.60(d, J=3.5, 1H), 5.71(s, 2H)
47	9.63(s, 1H), 7.20(d, J=3.5, 1H), 6.60(d, J=3.5, 1H), 5.10(s, 2H), 4.59(s, 1H), 3.80(m, 1H), 1.18(s, 1H), 1.14(s, 1H)
48	9.65(s, 1H), 7.28 - 7.71(m, 4H), 7.23(d, J=3.4, 1H), 6.89(s, 1H), 6.65(d, J=3.4, 1H), 5.22(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 313(M, 1), 294(1), 219(3), 269(1), 240(2), 187(22), 160(36), 109(100), 81(29), 53(22)
49	9.65(s, 1H), 7.51(m, 1H), 7.23(d, J=3.6, 1H), 7.16-7.20(m, 2H), 7.03-7.17(m, 2H), 6.73(s, 1H), 6.65(d, J=3.6, 1H), 5.22(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 279(M, 2), 235(1), 206(7), 153(35), 125(21), 109(100), 89(27), 80(38), 63(17), 53(28)
50	9.65(s, 1H), 7.25 - 7.35(m, 4H), 7.23(d, J=3.6, 1H), 6.71(s, 1H), 6.64(d, J=3.6, 1H), 5.21(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 324(M, 4), 281(2), 251(7), 250(7), 199(22), 197(21), 170(13), 126(2), 109(100), 90(30), 80(30), 63(20), 53(27)
51	9.65(s, 1H), 7.87(m, 1H), 7.21(d, J=3.2, 1H), 7.14(m, 1H), 7.07(s, 1H), 6.63(d, J=3.6, 1H), 6.46-6.50(m, 1H), 5.21(s, 2H), 3.82(s, 3H), 3.78(s, 3H). Mass(m/s(intensity)): 305(M, 30), 179(32), 152(71), 124(32), 109(100), 93(25), 81(28), 53(33)
52	9.63(s, 1H), 7.20(d, J=3.7, 1H), 6.57(d, J=3.6, 1H), 5.10(s, 2H), 4.65(s, 1H), 3.46(s, 1H), 1.10-1.95(m, 10H). Mass(m/s(intensity)): 251(M), 224, 178(1), 126(100), 109(52), 80(19), 53(19)
53	9.63(s, 1H), 7.20(d, J=3.7, 1H), 6.58(d, J=3.4, 1H), 5.11(s, 2H), 4.76(s, 1H), 3.18(q, J=6.5, 2H), 1.25-1.53(m, 4H), 0.92(t, J=6.5, 3H). Mass(m/s(intensity)): 225(M+), 152, 126(100), 109(34), 80(16), 53(16)
54	9.65(s, 1H), 7.15 - 7.38(m, 3H), 7.23(d, J=3.6, 1H), 6.73(s, 1H), 6.65(d, J=3.7, 1H), 5.22(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 313(M), 240(1), 187(47), 159(13), 124(47), 109(100), 80(29), 53(33), 41(36)
55	9.67(s, 1H), 8.12 - 8.16(m, 1H), 6.98-7.38(m, 3H), 7.23(d, J=3.2, 1H), 6.66(d, J=3.2, 1H), 5.25(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 279(M, 5), 235(5), 153(28), 125(22), 109(100), 80(33), 53(31)
56	9.64(s, 1H), 7.23(d, J=3.6, 1H), 6.63(d, J=3.7, 1H), 5.12(s, 2H), 4.74(s, 1H), 3.24(q, J=6.9, 2H), 1.14(t, J=7.4, 3H). Mass(m/s(intensity)): 197(M, 63), 169(43), 109(100), 90(90), 81(26), 69(38), 63(59), 53(38), 41(92)
57	9.64(s, 1H), 7.41 - 7.88(m, 7H), 7.21(d, J=3.4, 1H), 7.12(s, 1H), 6.64(d, J=3.5, 1H), 5.25(s, 2H). Mass(m/s(intensity)): 295(M, 8), 251(6), 222(14), 194, 169(100), 140(51), 126(20), 115(45), 109(69), 80(38), 53(33), 41(39)

- <86> <실험 예 1> 본 발명의 화합물(화합물 1)에 의한 조골세포 증식 및 효능 실험
- <86> <1-1> 본 발명의 화합물(화합물 1)에 의한 조골세포의 증식과 세포 활성도 증가 실험
- <87> 본 발명자들은 조골세포 증식과 세포 활성도를 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험들을 수행하였다.
- <88> 구체적으로, 본 발명의 화합물 1이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 3 가지의 세포를 사용하였다. 사람 세포로는 사람 골육종에서 유래된 2 가지 세포주인 MG-63 (ATCC No. CRL-1427)과 HOS (ATCC No. CRL-1543)를, 마우스의 세포로는 마우스 근육 세포인 C2C12 세포 (ATCC No. CRL-1772)를 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 배지에 배양하여 사용하였다.
- <89> 세포증식의 측정 (Cell proliferation)은 화합물 1의 독성을 간접적으로 평가하고, 또한 조골세포의 증식에 대한 천연물의 영향을 알아보기 위하여, 상기에 기술한 MG-63 조골세포를 이용하여 세포 증식시 세포의 DNA 안으로 유입된 ^{3}H -티미딘(thymidine)의 양을 측정하였다. 조골세포를 24-well plate에 well당 2×10^4 개가 되도록 분주하고, 다음날 1% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하였다. 교체된 배양액 내에, 일정 농도 범위내로 연속적으로 희석하여 준비한 천연물을 농도별로 첨가하고 48시간 배양하였다. 마지막 4시간 동안 $3 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 의 ^{3}H -티미딘 (thymidine)을 첨가하여 배양한 후 세포를 포스페이트(phosphate) 완충액으로 세척하고 5% ice cold 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA)로 처리하여 TCA-불용성인 분획을 분리한 후 0.1 M NaOH로 용해하였다. 이중 일정 분획을 취하여 liquid scintillation counter에서

방사능을 측정함으로써 ^3H -티미딘(thymidine) 유입도를 측정하였다. 결과는 하기 표 8 및 도 1에 나타내었다.

<90> 【표 8】

화합물 1 농도 (M)	조골세포 세포증식률 (%)
0	100.00 ±8.30
10^{-8}	101.38 ±4.65
10^{-7}	103.91 ±5.81
10^{-6}	105.56 ±5.49
10^{-5}	102.63 ±8.53
10^{-4}	105.50 ±5.90

<91> 골다공증으로부터 회복하기 위하여 골조직내에 존재하는 주된 골 형성세포인 조골세포의 증식이 선행되어야 한다. 본 발명에서 조골세포를 배양하면서 화합물 1을 첨가하여 조골세포의 수가 증가되는지 확인하였고, 그 결과 본 발명의 화합물 1을 첨가한 세포는 첨가하지 않은 대조군에 비해 약 105% 이상의 세포 증식 효과를 나타냈다(표 8 및 도 1). 상기 결과로부터 본 발명의 화합물이 조골세포의 증식에 효과가 있다는 것을 확인하였다.

<92> <1-2> 조골세포 표지효소인 염기성 인산분해효소 활성 측정(alkaline phosphatase activity; 조골세포의 표지효소)

<93> 본 발명자들은 화합물 1이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하

여, 상기 실험에 <1-1>에서 기술한 HOS 세포를 96-well plate에 각 well 당 5×10^3 cells이 되도록 분주하고 단층으로 증식한 후 일정 농도로 천연추출물을 배양액에 첨가하였으며, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 96-well plate에서 48시간 배양한 후에 세포를 0.1% Triton X-100/saline으로 37°C에서 30분 동안 처리하였다. 세포처리액의 일정량을 기질인 100 mM의 p-나트로페닐 포스페이트(nitrophenyl phosphate; PNPP) 존재하에 0.1N 글리신-NaOH 완충액 (pH 10.4)과 함께 37°C에서 30분간 반응시켜 기질인 PNPP로부터 유리되어 나온 PNP(p-nitrophenol)의 양을 405 nm에서 비색정량 하였으며, Lowry 변법 검색 방법으로 단백질의 양을 측정하여 효소의 활성을 nmol substrate cleaved/h/mg protein으로 표시하였다. 결과는 하기 표 9 및 도 2에 나타내었다.

<94> 【표 9】

화합물 1 농도 (M)	조골세포 염기성 인산분해효소 활성도 (%)
0	100.00 ± 6.82
10^{-8}	117.05 ± 3.13
10^{-7}	121.16 ± 4.93
10^{-6}	115.76 ± 2.67

<95> 염기성 인산분해효소는 조골세포의 표지효소로 이용되며 골조직 형성의 여러 단계에 관여할 것으로 보고되었으며 (Siffert, 1958 ; Farley와 Baylink, 1986), 본 발명에서는 화합물 1이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 조골세포 활성의 지표로 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, 화합물 1을 첨가한 세포는 첨가하지 않은 대조군에 비해 염기성 인산분해효소의 활성이 121%정도 증가하였다 (표 9 및 도 2 참조). 상기 결과로부터 본 발명의 화합물이 조골세포의 표지 효소인 염기성 인산분해효소의 활성에 우수한 효과를 나타내므로 조골세포의 활성에 효과가 있다는 것을 확인하였다.

- <96> <1-3> 조골세포 분화의 주요 전사인자인 Runx2의 발현측정
- <97> 각각의 세포에 골형성에 필수적인 전사인자인 Runx2가 결합하는 DNA sequence인 OSE2를 6개 직렬 연결한 것을 pGL3 promoter vector에 삽입한 6xOSE2-Luc vector를 transient transfection 하여 겸사대상 분획을 투여함으로써 활성화된 Runx2의 정도를 luciferase 활성으로 판정하는 방법을 선택하였고 그 자세한 방법은 하기와 같다.
- <98> 상기 실험예 <1-1>에서 배양한 C2C12 세포를 6-well plate의 well 당 1×10^5 seeding 한 후 24시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.
- <99> 24 시간 후 LipofectAmine를 이용하여 p6xOSE2-Luc:lipofectamine complex를 만들어 다음과 같이 transfection시켰다. 15분간 반응시키는 동안 세포의 배지를 제거한 후 DMEM (FBS free)으로 세포를 세척하였다. 6 well plate의 well 당 800 ul의 DMEM (FBS free)를 넣어주고, 반응이 끝난 207 μ l의 p6xOSE2-Luc:lipofectamine complex를 넣어 준 후 3시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3시간 배양 후 1 ml의 30% FBS가 들어있는 DMEM를 well 당 넣어준 후 24 시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.
- <100> 24 시간 후 세포의 배지를 제거한 후 DMEM (FBS free)으로 세포를 세척하였다. 6-well plate의 well 당 2 ml의 basic fibroblast growth factor (bFGF)가 10 ng/ml로 첨가되어 있는 DMEM (FBS free)를 처리하고 대조군은 bFGF가 첨가되어 있지 않는 DMEM (FBS free)를 처리하였다. 24시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 PBS 용액으로 세척 후 luciferase activity를 측정하였다. 결과는 하기 표 10 및 도 3에 나타내었다.

<01> 【표 10】

화합물 1 농도 (μ M)	Runx2 발현율 (%)
0	100.0
1	209.2
10	218.9

<102> 그 결과, 화합물 1은 1 및 10 μ M 농도에서 첨가하지 않은 대조군에 비하여 Runx2의 활성을 200%이상 촉진하였다(표 10 및 도 3. 참조). 골형성의 촉진을 위해서는 조골세포의 분화가 선행되어야 한다. 조골세포의 분화를 촉진하기 위해서는 분화를 위한 전사인자 (Runx2)의 발현이 필수적이며, 이는 조골세포가 필요로 하는 여러 유전자 (osteocalcin, osteopontin, type I collagen, bone sialoprotein)의 발현을 증가시킨다. 이를 유전자의 promoter에는 Runx2의 response element (OSE: osteoblast specific factor binding element)가 존재하며 그 중심의 consensus sequence에는 PuACCPuCA가 있다. 이는 조골세포의 골형성유전자의 발현을 증가시킨 것으로 골형성의 촉진에 관여함을 보여준다 (Lee 등, 2000; Park 등, 2001).

<103> <1-4> 파골세포 생성을 억제하는 osteoprotegerin (OPG)의 발현 측정

<104> 상기 실험에 <1-1>에서 기술한 MG63 세포주를 96-well plate에 confluent하게 배양한 다음, 여러 농도의 약용 천연물시료가 포함된 serum free DMEM 2 ml을 첨가하여 16시간 배양한 후 상청액을 수확하였다. OPG ELISA kit를 이용하여 OPG가 유리된 양을 측정하였다. 결과는 하기 표 11 및 도 4에 나타내었다.

<105>

【표 11】

화합물 1 농도 (M)	조골세포의 OPG 발현율 (%)
0	100.00 ±0.00
10^{-10}	185.36 ±0.56
10^{-8}	204.30 ±4.96
10^{-6}	866.90 ±0.59

106> 파골세포의 생성 및 활성에는 receptor activator of NF-kappa B receptor (RANKL)가 반드시 필요하다. RANKL은 조골세포 및 간엽세포에 존재하며 파골세포 전구세포 및 파골세포의 receptor activator of NF-kappa B (RANK)에 결합한다(Hofbauer 등, 2000). OPG는 RANKL의 decoy 수용기로써 RANKL와 RANK의 결합을 방해함으로써 파골세포 전구세포가 파골세포로 분화되는 것을 억제하며, 파골세포의 활성도 억제하게 된다(Kong 등, 1999; Yasuda 등, 1999; Suda 등, 1999; Aubin 등 2000). 본 발명에서는 조골세포를 배양하면서 화합물 1을 처리하여 OPG의 분비양이 증가됨을 관찰하고자 하였다.

107> 그 결과 본 발명의 화합물 1을 첨가한 경우 조골세포에서 파골세포의 생성을 억제하는 물질인 OPG 단백질의 발현율 실시예 1의 10^{-10} , 10^{-9} 및 10^{-8} M의 농도에서 각각 185%, 204% 및 866%까지 증가시켰다 (표 11 및 도 4 참조). 상기 결과로부터 본 발명의 화합물 1이 조골세포에서 파골세포의 생성을 억제하는 OPG를 발현시켜 파골세포의 생성을 억제하는 기능을 한다는 것을 확인하였다.

<108> <실험 예 2> 화합물 1에 의한 파골세포의 증식 억제작용

109> 본 발명자들은 화합물 1이 파골세포의 성장 및 활성에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 칼슘-포스페이트로 피막된 플레이트(OAAS, OCT Inc.)에 파골세포 전구세포를 배양하여

파골세포의 표지효소인 TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase activity 측정 이하 "TRAP"이라 약칭한다) 활성 및 흡수 활성도 (Resorption pit)를 분석하였다.

- <10> <2-1> 파골세포 전구세포의 순수 분리 및 성숙한 파골세포로의 분화 유도
- 마우스 골수세포를 분리하기 위해 7~9주 된 웅성 마우스를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하며 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.1% collagenase (Gibco), 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA (Gibco)가 포함된 효소용액 1 ml를 주사하여 골수를 꺼낸 후 30분간 교반하여 골수세포를 모아 10% FBS가 포함된 α-minimum essential medium (α-MEM)에 24시간 전 배양한 후 미부착 세포들을 수집하였다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 well당 2×10⁵개의 세포가 되도록 분주하여 배양한다. 8일간 배양하는 동안 20 ng/ml macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Peprotech, USA)와 30 ng/ml RANKL (Peprotech, USA)이 포함된 α-MEM에 화합물 1을 처리하며 배양하였다. 배양이 끝난 후 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 세포를 고정하여 TRAP 염색을 수행하였다. 또한 파골세포의 활성을 검사하기 위하여 세포를 떼어낸 후 흡수된 부위를 관찰하였다.
- <11> <2-2> TRAP(+)인 다핵세포 형성 측정
- 세포배양 후, 부착세포를 PBS로 세척 한 다음 시트레이트-아세테이트-포름알데하이드 (citrate-acetate-formaldehyde)로 5분간 고정시키고 나프톨 AS-BI 포스페이트(naphthol AS-BI phosphate), 페스트 가넷(fast Garnet) GBC 용액과 7 mM 타르트레이트 버퍼(tartrate buffer)

(pH 5)을 함유하는 37°C 아세테이트 버퍼(acetate buffer) (pH 5.0)에 1시간 동안 배양하여 TRAP 염색을 하였다. 3개 이상의 핵을 가지는 TRAP(+) 다핵세포들을 파골세포로 간주하였다. 결과는 표 12 및 도 5에 나타내었다.

<14> 【표 12】

화합물 1 농도 (M)	TRAP 양성 다핵세포의 수
0	132.80 ±10.50
10 ⁻⁸	105.20 ±8.58
10 ⁻⁷	120.00 ±6.42
10 ⁻⁶	103.60 ±6.95
10 ⁻⁵	108.20 ±4.57
10 ⁻⁴	77.20 ±6.73

<15> 파골세포는 골수내의 단핵구/대식세포 계통의 세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액내로 순환되며 골내막층에서 전구세포들이 증식되어 다핵세포를 형성하기 위해 융합된다 고 알려져 있으며 (Scheven 등, 1986), 파골세포에는 특징적으로 tartrate에 대해 저항성을 나타내는 acid phosphatase인 TRAP을 가지며 이는 다른 골조직 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다 (Minkin, 1982). 본 발명에서는 파골세포의 분화를 유도하기 위하여 파골세포의 전구세포가 있다고 알려진 골수를 이용하였으며, TRAP에 양성이며 다핵인 세포를 파골세포로 확인하였으며, 파골세포 전구세포를 배양하면서 화합물 1을 처리하여 8일 동안 배양한 후 처리하지 않은 대조군에 비하여 TRAP 양성 다핵세포의 수가 감소하는 것을 확인하고자 하였다.

<16> 그 결과 화합물 1을 첨가하였을 때 대조군에 비해 TRAP (+) 다핵세포의 수가 132개에서 77개로 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (도 5). 상기 결과로부터, 본 발명의 실시예 1의 화합물이 파골세포의 생성 억제 작용을 한다는 것을 확인하였다.

17> <2-3> 파골세포의 흡수와 관찰

18> 분화된 파골세포의 활성을 검사하기 위하여 칼슘-포스페이트로 피막된 plate (OAATM, OCT, Korea)에서 세포배양 후 배양액을 제거하였다. 세포배양 후 붙어있는 세포를 제거하기 위하여 culture plate를 증류수로 세척한 후 5% sodium hypochlorite 용액을 넣어 5분간 방치한 후 다시 증류수로 깨끗이 세척한 후 말린 다음 흡수된 부위를 Image pro plus를 이용하여 관찰하였다. 결과는 표 13 및 도 6에 나타내었다.

19> 【표 13】

화합물 1 농도 (M)	파골세포의 골흡수율 (%)
0	100.00 ± 0.67
10 ⁻⁸	66.03 ± 4.49
10 ⁻⁷	61.46 ± 0.35
10 ⁻⁶	41.75 ± 4.07
10 ⁻⁵	46.92 ± 3.60
10 ⁻⁴	52.34 ± 8.28

20> 골조직내에서 골흡수를 주로 담당하는 파골세포의 활성을 검사하기 위하여 골조직의 무기질 부분과 유사하게 제작한 칼슘과 포스페이트가 피막된 plate를 사용하여 (Choi 등, 2001) 파골세포의 전구세포를 배양하면서 화합물 1을 처리하여 대조군에 비하여 흡수 면적이 감소됨을 관찰하고자 하였다.

21> 그 결과 화합물 1을 첨가하였을 때 대조군에 비하여 흡수와 (resorption pit)의 면적이 50%까지 감소되는 것으로 나타났다(표 13 및 도 6 참조). 따라서 화합물 1이 파골세포의 활성을 억제하는 작용을 한다는 것을 확인하였다.

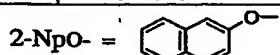
- 22> <2-4> 본 발명의 퓨란 유도체의 파골세포 생성 억제율 측정
- 23> 실험예 <2-1>에서 기술한 바와 같이 파골세포 전구세포의 순수 분리 및 성숙한 파골세포
로의 분화 유도한 후 실험예 <2-2>에서 기술한 TRAP(+)인 다핵세포 형성을 측정하였다. 그
결과는 화합물 농도가 0일 때 100 %로 보고, 그에 대한 백분율로 표기하여 파골세포 생성 억제
율로 표시하였다(표 14~16 참조).
- 24>

【표 14】

NO	X	Y	파골세포 생성 억제율(%)		
			0.1	1	10uM
1	H	HO-	0	0	30
32	H	C ₆ H ₅ CH ₂ COO-	0	23.3	50
33	H	2, 6-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-	0	3.3	50
34	H	2-C1-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-	0	16.7	36.7
35	H	3-C1-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-	0	23.33	43.33
36	H	3-SC ₄ H ₃ CH ₂ COO-	0	6.67	30
37	H	3-F-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-	0	10	6.67
38	H	2-NpCH ₂ COO-	0	23.33	20
39	H	2, 4-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-	0	10	56.67
40	H	(C ₆ H ₅) ₃ CCOO-	0	16.67	43.33
41	H	2-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-	0	6.67	56.67
42	H	3-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-	0	23.33	53.33
43	H	2-BrC ₁₄ H ₂₈ COO-	0	17.6	90.26
44	H	C ₁₄ H ₂₉ COO-	0	16.67	53.33
49	H	3-C1C ₆ H ₄ NHC ₆ H ₃ O-	0	10	0
50	H	4-BrC ₆ H ₄ NHC ₆ H ₃ O-	0	10	0
53	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHC ₆ H ₃ O-	0	10	36.67
54	H	3, 4-C1 ₂ C ₆ H ₃ NHC ₆ H ₃ O-	0	0	10
55	H	2-C1C ₆ H ₄ NHC ₆ H ₃ O-	0	20	20
59	CH ₃ O-	2-CH ₃ O-4-CH ₂ -CHCH ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	15.95
60	CH ₃ O-	2, 4-C1 ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	32.75
61	CH ₃ O-	2-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	11.66
66	CH ₃ O-	2-NO ₂ -4-C1C ₆ H ₃ O-	0	0	13.58
67	CH ₃ O-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	15.92
68	CH ₃ O-	2-(CH ₃) ₂ CH-5-CH ₃ C ₆ H ₃ O-	0	0	5.62
70	CH ₃ O-	3, 4-(CH ₃) ₃ C ₆ H ₃ O-	0	0	3.34
75	CH ₃ O-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-	0	0	0.78
79	CH ₃ O-	4-IC ₆ H ₄ O-	0	0	34.65
80	CH ₃ O-	4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	15.19
85	CH ₃ O-	(CH ₃) ₂ N-	0	0	3.75
89	CH ₃ O-	C ₆ H ₅ NH-	0	0	12.6
91	CH ₃ O-	(CH ₃) ₃ CNH-	0	0	9.89
94	(CH ₃) ₂ CHO-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-	0	0	5.9
95	(CH ₃) ₂ CHO-	2, 5-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	0.97
97	4-C1C ₆ H ₄ O-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-	0	0	12.75

【표 15】

NO	X	Y	파골세포 생성 억제율(%)		
			0.1	1	10μM
98	C ₆ H ₅ O-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-	0	0	9.89
100	HO-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	10.46
102	HO-	4-FC ₆ H ₄ O-	0	0	5.05
103	HO-	4-BrC ₆ H ₄ O-	0	0	2.77
107	HO-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-	0	0	32
108	HO-	2-BrC ₆ H ₄ O-	0	0	14.72
109	HO-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	3.25
112	HO-	3-C ₁ C ₆ H ₄ O-	0	0	7.79
114	HO-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-	0	0	4.2
117	HO-	1-NpO-	0	0	5.86
119	HO-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-	0	0	37.02
120	HO-	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	0	0	27.99
121	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)NH-	4-IC ₆ H ₄ O-	0	0	7.12
123	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-	0	6.9	100
124	CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	7.62
127	(CH ₃) ₃ CNH-	CF ₃ CH ₂ O-	0	0	13.82
128	(CH ₂) ₆ N-	2-BrC ₆ H ₄ O-	6.54	0	97.65
129	(CH ₃) ₃ CNH-	2-BrC ₆ H ₄ O-	0	0	2.2
130	(CH ₃) ₂ CHNH-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ NH-	0	0	7.84
132	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	3-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-	0	0	62.30
133	(CH ₂) ₆ N-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	0.5
134	(CH ₂) ₅ CHNH-	4-(CH ₃) ₂ CC ₆ H ₄ O-	0	0	21.42
136	C ₆ H ₅ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-	0	0	2.49
137	C ₆ H ₅ NH-	2-NpO-	0	0	38.3
140	3-BrC ₆ H ₄ NH-	4-FC ₆ H ₄ O-	0	0	11.93
141	4-FC ₆ H ₄ NH-	3-C ₁ C ₆ H ₄ O-	0	0	13.01
142	3-C ₁ -4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-	0	0	32.17
143	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-	0	0	10.63
144	2-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-	0	21.95	85.25
145	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-	0	5.98	83.3
146	4-BrC ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-	0	0	10.03
147	4-FC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-	6.11	19.4	99.72
148	4-NH ₂ COC ₆ H ₄ NH-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-	0	3.05	47.55
149	2-NO ₂ -4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-	0	10.32	78.34
150	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-	0	0	19.12



【표 16】

NO	X	Y	파골세포 생성 억제율(%)		
			0.1	1	10μM
151	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	19.8
152	2-CH ₃ -5-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-	5.37	0.08	37.56
155	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-	0	0	27.92
156	2,3-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-	13.01	18.26	98.48
157	2-CH ₃ O ₂ C ₆ H ₄ NH-	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-	4.87	10.71	97.46
158	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	23.57
160	4-CH ₃ COOC ₆ H ₄ NH-	1-NpO-	0	0	38.96
161	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	11.33
163	3-CH ₃ CH ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-	0	0	51.2
164	3,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	30.52
165	(CH ₃) ₃ CNH-	4-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ O-	12.35	28.76	88.75
166	2-CH ₃ O ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-	0	0	1.08
167	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	2,4-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-	0	22.42	96.47
169	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ -C ₆ H ₄ O-	0	0	21.04
170	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-	0	0	16.31
171	2-CH ₃ O-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	0.42
172	2,3-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-	0	0	11.08
173	4-C1C ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	8.03
174	2-C1C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-	0	0	14.11
175	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-	0	0	33.33
176	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-CH ₃ O-4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	15.56
177	2-FC ₆ H ₄ NH-	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	11.03
178	2-FC ₆ H ₄ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	14.09
179	2,6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	34.81
180	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	8.15
181	2-C1-5-CF ₃ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	56.96
182	2-CH ₃ O-4-NO ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	4.34
183	2-NO ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-	0	0	57.39
185	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2,3,5,6-F ₄ C ₆ H ₃ O-	0	0	13.64
186	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-	0	0	21.09
187	3-CH ₃ CONHC ₆ H ₄ NH-	C ₆ F ₅ O-	21.4	37.05	36.74
188	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-	0	0	7.6
189	2-CH ₃ O ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-	0	0	48.99
190	4-IC ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-	0	0	5.12
191	3-NO ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-	0	0	8.06

<127> 상기 표에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 퓨란 유도체는 파골세포 생성 억제효과를 나타내고 있다. 구체적으로, 0.1 μM 투여한 결과, 화합물 128, 147, 152, 156, 157, 165, 187의 파골세포 생성 억제율이 4~21 % 이었으며, 10 μM 투여한 경우 대부분의 퓨란 유도체들이 파골세포의 생성 억제효과를 나타내고 있다.

28> <실험 예 3> 동물모델을 이용한 임상조직실험

29> 본 발명자들은 난소절제술(Ovariectomy)을 시행하여 골다공증이 유도된 자성 백서를 실험모델로 이용하여 본 발명의 화합물이 골다공증의 치료 및 예방에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 난소절제 백서에 화합물 1을 투여한 후, 경골을 절단하여 조직관찰을 수행하였다.

130> <3-1> 난소 절제술

131> 100 mg/kg의 케타민 (Ketamine, Ketara) 과 2% 자이라진 (Xylazine, Rompun 0.15 ml/kg)로 전신마취 후 통상의 방법에 따라 제모 및 술전 무균처리(10% povidone-iodine scrub followed by a 70% alcohol wipe)를 수행하였다.

132> 백서 복측 중앙에 1 cm 가량의 절개를 시행한 뒤 횡격막이나 간 등 주용 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의를 하며 자궁을 따라 난소를 확인하였다. 봉합용 실로 난소를 결찰한 뒤 난소 절제를 양측으로 시행하였다. 난소 절제 후 각 장기를 복강 내로 재위치 시킨 후 봉합용 실로 충별 봉합을 시행하였다. 수술 후 감염방지를 위해 항생제 세파졸린 (cefazolin 50 mg/kg)를 주사하였다.

<133> <3-2> 화합물 1의 화합물 투여

<134> 자성백서 한 마리에 대한 약물 투여량은 몸무게 250 g를 기준으로 시행하였다. 구체적으로 대조군 백서는 고형사료와 마리당 30 ml의 물만을 투여하였으며 실험군 백서의 약물투여(경구투여)는 마리 당 물 30 ml에 화합물 1을 10 mg을 물병에 섞어 투여하였고 매일 아침, 하루분

량 만큼의 약물을 제조하고 남은 양은 버리지 않고 남은 양에 상관없이 원액을 마리 수에 따라 넣고 물은 항상 마리 수 기준으로 채웠다. 물병은 바뀌지 않도록 주의하며 매일 마리 수를 확인하고 마리 수에 따라 약물을 제조하였다.

- <135> 화합물 1의 골다공증 예방효과를 알아보기 위해서는 난소절제를 시행 한 직후부터 4주 동안 상기 약물 투여 방법과 동일한 방법으로 약물을 4주간 투여하였다. 약물 투여 4주 후 실험군 16마리와 대조군 4마리를 표본으로 추출하였다. 그리고 백서의 몸무게 변화를 측정하고 경골(Tibia) 조직편을 통법에 따라 고정, 탈수, 명화, 염색 후 조직학적 관찰을 시행하였다.
- <136> 화합물 1의 치료효과를 알아보기 위해서는 난소절제 후 4주동안 동일 조건하에서 고형사료로 사육하고 난 후 골다공증의 변화를 확인한 후 실험군에는 상기 약물 투여방법과 동일하게 4주동안 약물을 투여하고 대조군은 계속하여 고형사료만으로 사육하였다. 난소절제 후 8주가 되는 때에 통법에 따라 조직편을 제작하였다.

<137> <3-3> 조직표본의 광학 현미경 관찰

- <138> 상기 실험예 <3-2>에서 추출된 조직표본은 고정액 (Bouin's solution)으로 약 24시간 고정하였다. 그 후 이들 조직으로부터 칼슘을 포함한 무기질을 제거하여 조직을 박절하기 적합한 정도로 연화시키기 위해 5% 질산으로 약 60시간 탈회과정 (Decalcification)을 시행하였다. 이 후 흐르는 물로 12시간 수세하고 알코올 70%부터 상승 농도순으로 각 2시간씩, 80%, 90%, 95%, 100%알코올에서 2시간 씩 3회 탈수를 시킨 다음 Xylene으로 명화 과정을 2시간씩 각 3회 실시하였다. 파라핀 침투를 위해 액상 파라핀에서 2시간 씩 3회 처리 후 시료를 파라핀으로 포매하였다.

- 39> 파라핀 블록 제작 후 표본제작은 rotary microtome을 이용하여 $4\mu\text{m}$ 두께로 박절편을 만 들어 Poly-L-lysin으로 코팅된 슬라이드글라스에 부착시켜 신전기(40KV)를 이용하여 건조시켰다. 완전히 건조된 슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 알코올을 통하여 탈수 시킨 후 Hematoxylin-Eosin 이중염색을 하거나 Gomori 염색 (Gomori's trichrome stain)을 시행하였다. 염색한 조직은 다시 알코올과 자일렌을 통과 시켜 봉입제로 슬라이드를 봉입하고 60°C incubator에서 하루동안 건조시킨 후 광학현미경으로 검경 및 촬영을 실시하였다.
- 140> <3-4> 골다공증 예방효과 1
- 141> 몸무게 200g 내외의 자성 백서 20마리를 선택하여 실험군 (16마리)과 대조군(4마리)으로 나누어 상기 기술한 난소 절제술을 따라 난소를 절제한 후, 약물 투여 4주 동안 실험군과 대조군을 동일한 조건하에서 상기 기술한 약물을 투여 방법과 동일한 방법으로 실험군 백서에 약물을 투여하였다. 약물 투여 4주 후, 즉 난소 절제술이 시작된 지 4주가 된 실험군과 대조군의 표본을 추출하여 백서의 몸무게 변화를 측정하고 경골(Tibia)의 조직편을 통법에 따라 고정, 탈수, 명화, 염색 후 조직학적 관찰을 시행하였다.
- 142> 그 결과, 12.5배로 관찰한 결과 화합물 1을 투여하지 않은 대조군에서는 척추뼈의 가장 자리 피질골과 내부의 소주골이 소실되었고 (도7의 a), 화합물 1을 투여한 실험군에서는 소주골이 소실되지 않았다 (도7의 b). 또한 40배로 관찰한 결과 대조군에 비해 화합물 1을 투여한 실험군에서는 피질골과 소주골이 두터워졌고, 골수강부분이 소주골로 채워진 경골 (tibia) 횡단면이 관찰되었다 (도 8).

13> <3-5> 골다공증 예방효과 2

- 14> 몸무게 200g 내외의 자성 백서 20마리를 선택하여 실험군(16마리)과 대조군(4마리)으로 나누어 4주 동안 약물을 투여하였다. 약물 투여방법은 식염수 1 ml에 실시예 1 10 mg을 녹여서 피하주사로 투여하였다. 대조군에는 식염수 1 ml을 동일한 방법으로 투여하였다. 4주간 약물을 투여한 백서는 몸무게 변화를 측정하고 경골 (Tibia)의 조직편을 통법에 따라 고정, 탈수, 명화, 염색 후 조직학적 관찰을 시행하였다.
- 45> 그 결과 대조군은 골수강내의 소주골의 감소와 피질골의 천공이 관찰되었으나 화합물 1을 투여한 실험군에서는 소주골 감소와 피질골의 천공이 감소되어 있었다. 따라서 본 발명의 화합물 1이 골다공증 예방에 현저한 효과가 있다는 것을 확인하였다 (도 9).

146> <3-6> 치료효과

- 147> 난소절제를 시행 한 후 4주 동안 동일 조건하에서 고형사료로 사육하고 골다공증의 변화를 확인한 후 화합물 1 220 μ l를 물 30ml에 녹여 경구로 4주간 투여하였다. 약물 투여 4주 후 실험군 16마리와 대조군 4마리를 표본으로 추출하였다. 그리고 백서의 몸무게 변화를 측정하고 경골(Tibia) 조직편을 통법에 따라 고정, 탈수, 명화, 염색 후 조직학적 관찰을 시행하였다.
- 148> 그 결과 대조군은 심한 골소주의 감소를 나타내었으나 화합물 1을 투여한 실험군에서는 그 정도가 미약하였다. 따라서 본 발명의 화합물 1이 이미 진행된 골다공증의 치료에 대해서 도 골감소 방지 효과가 있다는 것을 확인하였다(도 10).

:149> <실험 예 4> 골 밀도측정기(Bone mineral densitometer; BMD)를 이용한 임상적 효능시험

50> <4-1> 예방효과

- 51> 250g 내외의 백서를 골라 난소 절개를 한 후 4주간 마리당 10 mg 약물을 경구 투여하였다. 난소절개 전 골밀도 측정을 시행한 후 1주 간격으로 반복하여 4주간 BMD 측정을 시행하였다. BMD측정을 위해 독일에 제조한 XCT 540 Research SA을 이용하였다.
- 52> 케이지 안에 사육중인 백서를 Ketamin HCl(ketara 10mg/kg)과 2% xylazine HCl(Roupun 0.15ml/kg) 혼합액을 복강에 투여하여 전신 마취시킨 후 voxel size 0.1mm x 0.1mm, BMD 산출을 위한 Threshold 값은 280mg/cm²(해면골 측정), 500mg/cm²(치밀골 측정)으로 설정하였다. Scout scan (10mm/sec)를 통하여 경골(Proxima tibia)의 측정위치를 정하고 CT scan(7mm/sec)을 통해 정해진 위치에서 3개의 slice에서 골밀도 (BMD)값을 측정하였으며 동일 위치에서 2회 이상 촬영하고 4주간 매주 반복하였다.
- 53> 그 결과 난소절제를 시행한 대조군에서는 시간이 경과함에 따라 골밀도가 평균 19% 정도 감소하였으나 화합물 1을 투여한 실험군에서는 난소절제 전과 비슷한 상태를 계속 유지하였으며 4주 후에는 난소절제 전보다 더 증가된 골밀도를 나타내었다. 따라서 본 발명의 화합물은 골다공증 예방에 효과가 있음을 나타냈다 (표 17 및 도 11).

54> 【표 17】

골밀도변화량 (%)		
(시간) 주	대조군	실시예 1
0	0.0	0.0
1	-7.5	-2.5
2	-11.6	-3.2
3	-14.9	-1.8
4	-18.6	3.7

<155> <4-2> 치료효과

- 56> 250 g 내외의 백서를 골라 난소 절개를 한 후 4주간 사육하였다. 4주 후 골다공증 유발
을 골밀도 측정기를 통해 확인 후 4주간 마리당 화합물 1을 $220\mu\text{l}$ 로 물 30 ml에 녹여 경구로 4
주간 투여하였다.
- 57> 난소절제 전 골밀도 측정을 시행한 후 1주 간격으로 반복하여 8주간 골밀도(BMD) 측정을
시행하였다. BMD측정을 위해 독일에 제조한 XCT 540 Research SA을 이용하였다.
- 58> 케이지 안에 사육중인 백서를 Ketamin HCl(ketara 10mg/kg)과 2% xylazine HCl(Roupun
0.15ml/kg) 혼합액을 복강에 투여하여 전신 마취시킨 후 voxel size 0.1mm x 0.1mm, BMD 산출
을 위한 Threshold 값은 280mg/cm^2 (해면골 측정), 500mg/cm^2 (치밀골 측정)으로 설정하였다.
Scout scan (10mm/sec)를 통하여 경골(Proxima tibia)의 측정위치를 정하고 CT scan(7mm/sec)
을 통해 정해진 위치에서 3개의 slice에서 골밀도 (BMD)값을 측정하였으며 동일 위치에서 2회
이상 촬영하고 8주간 매주 반복하였다.
- 159> 그 결과 8주간 진행된 골밀도 변화에서 난소가 제거된 대조군 백서는 약 22%의 골밀도
감소를 관찰할 수 있었다. 반면에 화합물 1을 투여한 백서는 약 15% 골밀도 감소를 보였다.
따라서 화합물 1이 골밀도 변화, 즉 골 형성 및 감소에 영향을 주고 있음을 확인할 수 있고 골
다공증 치료에 효과가 있음을 알 수 있다(표 18 및 도 12).
- :160>

【표 18】

시간(주)	글필도변화량 (%)	
	대조군	실시예 1
0	0	0
1	-3	-2.9
2	-10	-10.5
3	-15	-14
4	-19	-17
5	-21.8	-16.5
7	-25.9	-19
8	-32	-21.4

161> <실험 예 5> 마우스와 렉트에 대한 경구투여 급성 독성실험

162> 6주령의 특정 병원체부재 (specific pathogen-free, SPF) SD계 렉트를 사용하여 급성독성 실험을 실시하였다. 군당 2마리씩이 동물에 본 발명의 화합물 1을 각각 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 혼탁하여 1회 단회 경구투여 하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중 변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 시행하였으며, 부검하여 육안으로 복강 장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

163> 그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 실시예 1은 모두 마우스에서는 1910 mg/Kg, 렉트에서는 3100 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않으며, 경구 투여 최소치사량 (LD_{50})은 마우스에서는 1910 mg/Kg이고, 렉트에서는 3100 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

<164> <제제 예 1> 캡슐제의 제조방법

65> 실시예 1의 화합물 5 mg을 락토오스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

66> 상기 분말 및 캡슐제의 구성성분은 다음과 같다.

167> 실시예 1의 화합물 5.0 mg

168> 락토오스 14.8 mg

169> 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg

170> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

171> <제제 예 2> 주사액제의 제조방법

172> 실시예 1의 화합물 10 mg, 만니톨 180 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg 및 증류수 2974 mg을 함유시켜 주사제를 제조하였다. 상기 용액을 병에 넣고 20??에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

173> 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.

174> 실시예 1의 화합물 10 mg

175> 만니톨 180 mg

176> $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

177> 증류수 0.2 mg

<178> <제제 예 3> 음료의 제조방법

79> 실시예 1의 화합물 0.1 g, 비타민 C, 분말비타민 E, 젓산철, 산화아연, 니코틴산
아미드, 비타민 A, 비타민 B₁ 및 비타민 B₂를 혼합하여 제조하였다.

80> 상기 음료의 구성성분은 다음과 같다.

81> 실시예 1의 화합물 0.1 g

82> 비타민 C 15 g

83> 분말비타민 E 7.5 g

84> 젓산철 19.75 g

85> 산화아연 3.5 g

86> 니코틴산아미드 3.5 g

87> 비타민 A 0.2 g

88> 비타민 B₁ 0.25 g

89> 비타민 B₂ 0.3 g

90> 물 적량

【발명의 효과】

91> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 퓨란 유도체는 종래 골다공증 치료제들에서 나타나는 문제점이 나타나지 않으며 조골세포의 증식을 촉진시키고, 조골세포의 활성을 증진시키며, 파골세포의 증식 및 활성을 억제하는 활성을 갖기 때문에, 성장기 어린이의 키 성장과 골다공증, 퇴행성 골질환 및 류마티스 관절염과 같은 골질환 등의 예방 및 치료에 유용하

102 2536

출력 일자: 2003/10/29

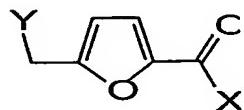
게 사용될 수 있다. 또한, 독성이 전혀 없으므로 건강 보조 식품으로도 널리 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 퓨란 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

화학식 1



(상기 식에서,

X는 H, OH, OR, NR¹R²이며,

Y는 OR, NR¹R², SC(=NH₂)NH이다.

여기서, R는 수소, 나프탈렌, 또는 메틸, 매톡시, 클로로, 브로모, 요오도, 니트로 및 플로린으로 이루어진 치환기 중에서 3 개 이하의 치환기를 갖는 아릴 또는 4 개 이하의 플로린이 치환된 C₁~C₄의 지방족 알킬기이며,

R¹, R²는 각각 수소, 나프탈렌 또는 메틸, 매톡시, 클로로, 브로모, 요오도, 니트로 및 플로린으로 이루어진 치환기 중에서 3 개 이하의 치환기를 갖는 아릴 또는 C₁~C₃의 지방족 알킬기이며, 또는 R¹, R²가 탄소, 산소 또는 수소 혹은 C₁~C₃의 지방족 알킬기를 갖는 질소로 서로 연결된 구조를 갖는 지방족 알킬기이다.)

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 X 및 Y가 하기 표 1 내지 표 7에 나타난 X 및 Y의 쌍으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 쌍인 것을 특징으로 하는 퓨란 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

표 1

NO	X	Y
1	H	HO-
2	H	CH ₃ COO-
3	H	C ₆ F ₅ O-
4	H	CH ₃ O-
5	H	3, 4-Cl ₂ C ₆ H ₃ O-
6	H	4-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
7	H	2, 4, 6-Cl ₃ C ₆ H ₂ O-
8	H	4-BrC ₆ H ₄ O-
9	H	3-CH ₃ -4ClC ₆ H ₃ O-
10	H	C ₆ C ₁₅ O-
11	H	4-CNC ₆ H ₄ O-
12	H	3-CF ₃ C ₆ H ₄ O-
13	H	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
14	H	2, 4-F ₂ C ₆ H ₃ O-
15	H	3-BrC ₆ H ₄ O-
16	H	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
17	H	2-BrC ₆ H ₄ O-
18	H	3-C1-4-FC ₆ H ₃ O-
19	H	2-C1-4-BrC ₆ H ₃ O-
20	H	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
21	H	3-CH ₃ -4-NO ₂ C ₆ H ₃ O-
22	H	2-C1-4-FC ₆ H ₃ O-
23	H	2, 3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O-
24	H	2-NO ₂ -4-C1C ₆ H ₃ O-
25	H	4-C1C ₆ H ₄ O-
26	H	2, 4-Cl ₂ C ₆ H ₃ O-
27	H	2-(CH ₃) ₂ CH-4-C1-5-CH ₃ C ₆ H ₂ O-
28	H	2, 4, 6-Br ₃ C ₆ H ₂ O-
29	H	2-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
30	H	2, 6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-

표 2

NO	X	Y
31	H	C ₆ H ₅ COO-
32	H	C ₆ H ₅ CH ₂ COO-
33	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-
34	H	2-C1-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
35	H	3-C1-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-
36	H	3-SC ₄ H ₃ CH ₂ COO-
37	H	3-F-C ₆ H ₄ CH ₂ COO-
38	H	2-NpCH ₂ COO-
39	H	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ COO-
40	H	(C ₆ H ₅) ₃ CCOO-
41	H	2-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
42	H	3-CH ₃ O-6-FC ₆ H ₃ CH ₂ COO-
43	H	2-BrC ₁₄ H ₂₈ COO-
44	H	C ₁₄ H ₂₉ COO-
45	H	4-FC ₆ H ₄ NHCOO-
46	H	C ₆ H ₅ NHCOO-
47	H	(CH ₃) ₂ CHNHCOO-
48	H	3-CF ₃ C ₆ H ₄ NHCOO-
49	H	3-C1C ₆ H ₄ NHCOO-
50	H	4-BrC ₆ H ₄ NHCOO-
51	H	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NHCOO-
52	H	C ₆ H ₁₁ NHCOO-
53	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCOO-
54	H	3,4-C1 ₂ C ₆ H ₃ NHCOO-
55	H	2-C1C ₆ H ₄ NHCOO-
56	H	CH ₃ CH ₂ NHCOO-
57	H	2-NpNHCOO-
58	CH ₃ O-	3,5-C1 ₂ -4-NH ₂ C ₆ H ₂ C(NH ₂)=NO-
59	CH ₃ O-	2-CH ₃ O-4-CH ₂ =CHCH ₂ C ₆ H ₃ O-
60	CH ₃ O-	2,4-C1 ₂ C ₆ H ₄ O-

표 3

NO	X	Y
61	CH ₃ O-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
62	CH ₃ O-	2-BrC ₆ H ₄ O-
63	CH ₃ O-	2,4-C _{1,2} C ₆ H ₄ O-
64	CH ₃ O-	2-NpO-
65	CH ₃ O-	C ₆ F ₅ O-
66	CH ₃ O-	2-NO ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
67	CH ₃ O-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
68	CH ₃ O-	2-(CH ₃) ₂ CH-5-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
69	CH ₃ O-	4-C ₁ -C ₆ H ₄ O-
70	CH ₃ O-	3,4-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₃ O-
71	CH ₃ O-	2-C ₁ -4-BrC ₆ H ₃ O-
72	CH ₃ O-	2-C ₁ -4-FC ₆ H ₃ O-
73	CH ₃ O-	3-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
74	CH ₃ O-	2-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
75	CH ₃ O-	3-CH ₃ -4-C ₁ C ₆ H ₃ O-
76	CH ₃ O-	2,4-(CH ₃)C ₆ H ₃ O-
77	CH ₃ O-	3,5-(CH ₃) ₂ -4-C ₁ C ₆ H ₂ O-
78	CH ₃ O-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
79	CH ₃ O-	4-IC ₆ H ₄ O-
80	CH ₃ O-	4-C ₁ C ₆ H ₄ O-
81	CH ₃ O-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
82	CH ₃ O-	HN=C(NH ₂)S-
83	CH ₃ O-	2-NpO-
84	CH ₃ O-	C ₆ F ₅ O-
85	CH ₃ O-	(CH ₃) ₂ N-
86	CH ₃ O-	HN=C(NH ₂)S-
87	CH ₃ O-	(CH ₂) ₅ N-
88	CH ₃ O-	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N-
89	CH ₃ O-	C ₆ H ₅ NH-
90	CH ₃ O-	(CH ₂) ₄ N-

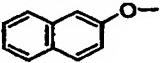
2-NpO- = 

표 4

NO	X	Y
91	CH ₃ O-	(CH ₃) ₃ CNH-
92	CF ₃ CH ₂ O-	2-NpO-
93	(CH ₃) ₂ CHO-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
94	(CH ₃) ₂ CHO-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
95	(CH ₃) ₂ CHO-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
96	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-	CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ O-
97	4-C ₁ C ₆ H ₄ O-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
98	C ₆ H ₅ O-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
99	CH ₂ =CHCH ₂ O-	2,4-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
100	HO-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
101	HO-	CHF ₂ CF ₂ CH ₂ O-
102	HO-	4-FC ₆ H ₄ O-
103	HO-	4-BrC ₆ H ₄ O-
104	HO-	2-NpO-
105	HO-	3-CF ₃ C ₆ H ₄ C(CH ₃)=NO-
106	HO-	2,4-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
107	HO-	2-C ₁ C ₆ H ₄ O-
108	HO-	2-BrC ₆ H ₄ O-
109	HO-	2,5-C ₁ ₂ C ₆ H ₃ O-
110	HO-	4-FC ₆ H ₄ O-
111	HO-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₄ O-
112	HO-	3-C ₁ C ₆ H ₄ O-
113	HO-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
114	HO-	4-(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₄ O-
115	HO-	4-C ₁ -2-NO ₂ C ₆ H ₃ O-
116	HO-	3-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
117	HO-	1-NpO-
118	HO-	4-CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)C ₆ H ₄ O-
119	HO-	4-C ₁ -3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
120	HO-	C ₆ H ₅ CH ₂ S-

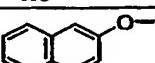
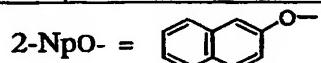
2-NpO- = 

표 5

NO	X	Y
121	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
122	3-CH ₃ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
123	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-	4-CI-3-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
124	CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₄ O-
125	(CH ₂) ₄ CHNH-	CF ₃ CH ₂ O-
126	(CH ₂) ₆ CHNH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
127	(CH ₃) ₃ CNH-	CF ₃ CH ₂ O-
128	(CH ₂) ₆ N-	2-BrC ₆ H ₄ O-
129	(CH ₃) ₃ CNH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
130	(CH ₃) ₂ CHNH-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₃ NH-
131	CH ₃ N(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
132	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N-	3-CH ₃ -4-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
133	(CH ₂) ₆ N-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
134	(CH ₂) ₅ CHNH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
135	(CH ₂) ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
136	C ₆ H ₅ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
137	C ₆ H ₅ NH-	2-NpO-*
138	4-CI ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
139	3-F-4-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
140	3-BrC ₆ H ₄ NH-	4-FC ₆ H ₄ O-
141	4-FC ₆ H ₄ NH-	3-CI ₂ C ₆ H ₄ O-
142	3-CI-4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	2-CI ₂ C ₆ H ₄ O-
143	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
144	2-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
145	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
146	4-BrC ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
147	4-FC ₆ H ₄ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
148	4-NH ₂ CO ₂ C ₆ H ₄ NH-	2,5-CI ₂ C ₆ H ₃ O-
149	2-NO ₂ -4-CH ₃ OC ₆ H ₃ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
150	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-CI ₂ C ₆ H ₃ O-



NO	X	Y
151	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-
152	2-CH ₃ -5-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
153	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
154	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
155	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ -4-CH ₃ C ₆ H ₃ O-
156	2,3-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
157	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
158	2-F-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	2-NO ₂ C ₆ H ₄ O-
159	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	4-I-C ₆ H ₄ O-
160	4-CH ₃ COC ₆ H ₄ NH-	1-NpO-
161	2,5-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-
162	2-F-4-BrC ₆ H ₃ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-
163	3-CH ₃ CH ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-F-C ₆ H ₄ O-
164	3,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
165	(CH ₃) ₃ CNH-	4-CH ₃ CH ₂ OC ₆ H ₄ O-
166	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
167	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	2,4-C1 ₂ C ₆ H ₃ O-
168	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
169	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ -C ₆ H ₄ O-
170	2,5-C1 ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ O-
171	2-CH ₃ O-5-CH ₃ C ₆ H ₃ NH-	3-C1C ₆ H ₄ O-
172	2,3-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₃ O-
173	4-C1C ₆ H ₄ NH-	3-CH ₃ -4-C1C ₆ H ₄ O-
174	2-C1C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
175	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ O-
176	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-CH ₃ O-4-CH ₃ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃ O-
177	2-FC ₆ H ₄ NH-	3,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
178	2-FC ₆ H ₄ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
179	2,6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-

표 7

NO	X	Y
180	2-CH ₃ O ₂ CC ₆ H ₄ NH-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
181	2-C1-5-CF ₃ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
182	2-CH ₃ O-4-NO ₂ C ₆ H ₃ NH-	4-C1C ₆ H ₄ O-
183	2-NO ₂ C ₆ H ₃ NH-	2-C1C ₆ H ₄ O-
184	4-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	CHF ₂ CF ₂ CH ₂ O-
185	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	2,3,5,6-F ₄ C ₆ H ₃ O-
186	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ NH-	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ O-
187	3-CH ₃ CONHC ₆ H ₄ NH-	C ₆ F ₅ O-
188	2,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
189	2-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	4-(CH ₃) ₃ CC ₆ H ₄ O-
190	4-IC ₆ H ₄ NH-	2-BrC ₆ H ₄ O-
191	3-NO ₂ C ₆ H ₄ NH-	4-IC ₆ H ₄ O-

【청구항 3】

제 1항의 퓨란 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

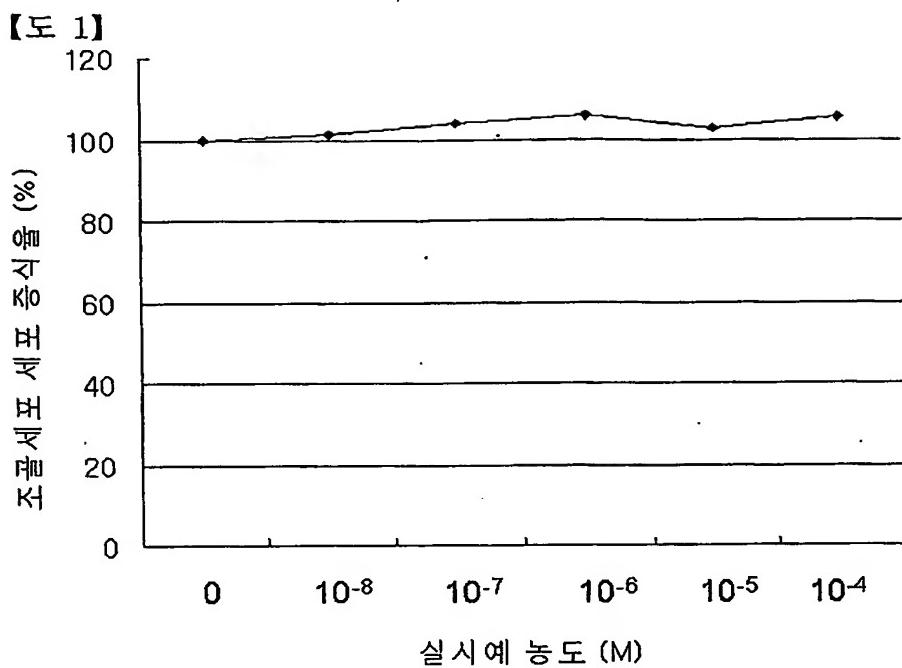
【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 골질환이 골다공증, 퇴행성 골질환 및 류마티스 관절염인 것을 특징으로 하는 골질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

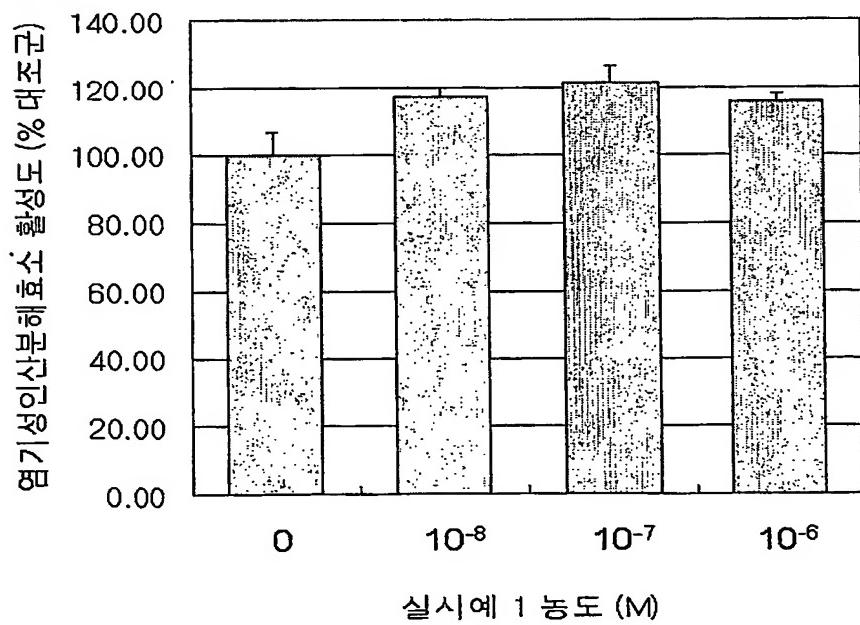
【청구항 5】

제 1항의 퓨란 유도체 및 그의 염을 유효성분으로 하는 기능성 식품, 건강보조식품 또는 특수영양식품.

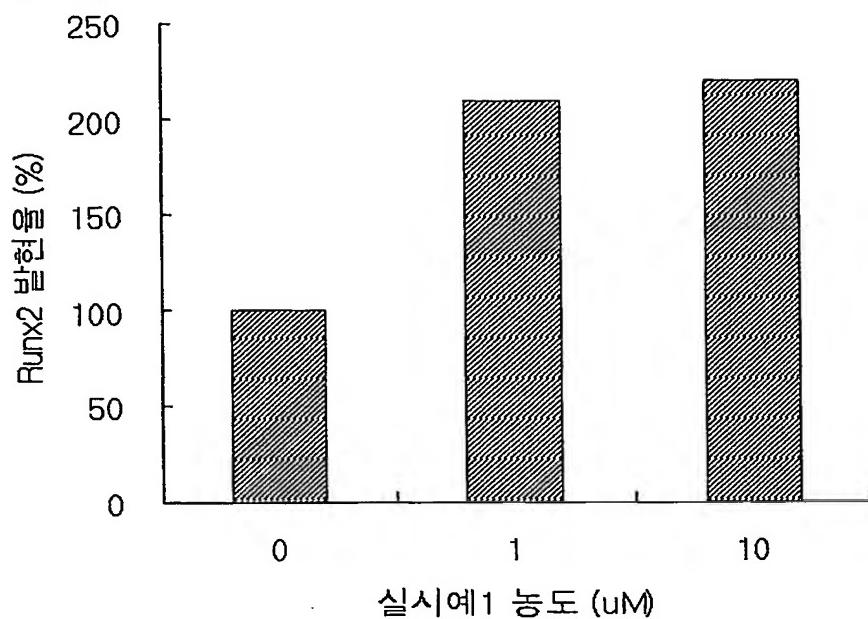
【도면】



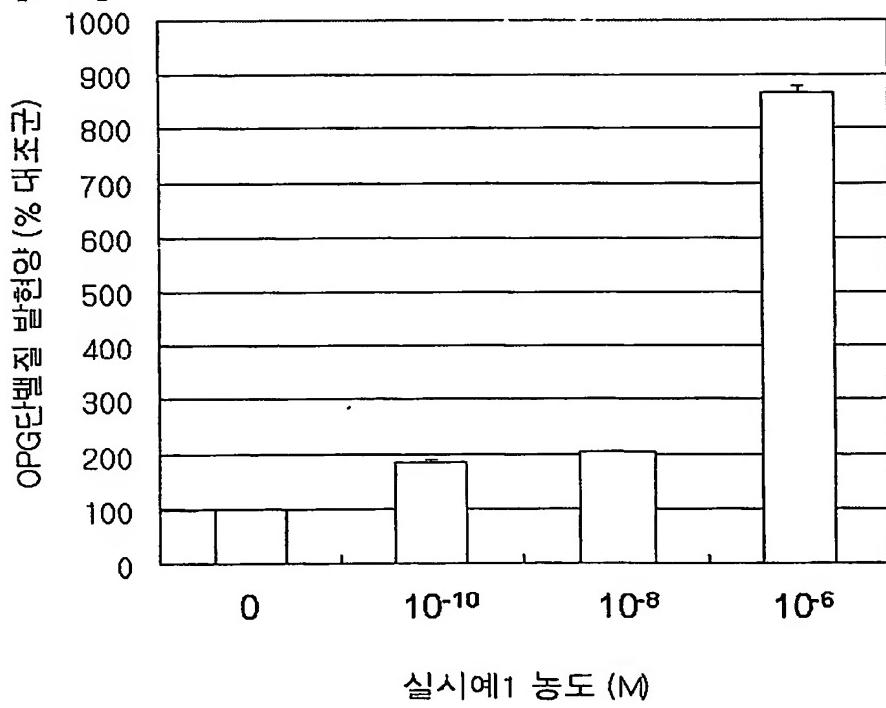
【도 2】



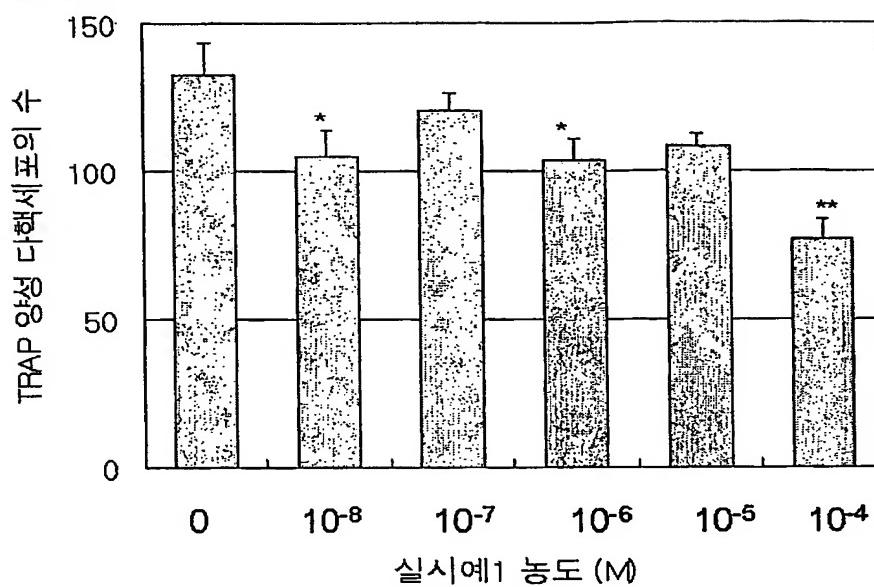
【도 3】



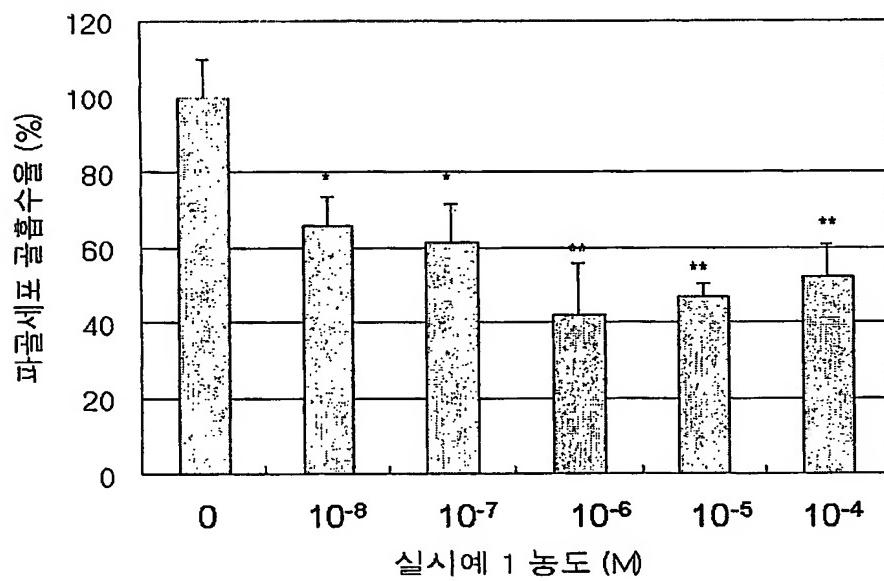
【도 4】



【도 5】



【도 6】



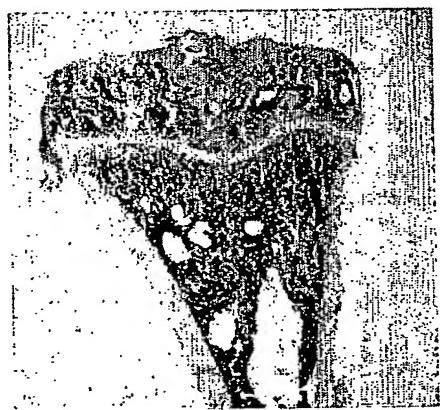
1020 2536

출력 일자: 2003/10/29

【도 7】



(a)



(b)

1020 2536

출력 일자: 2003/10/29

【도 8】



(a)



(b)

【도 9】



(a)

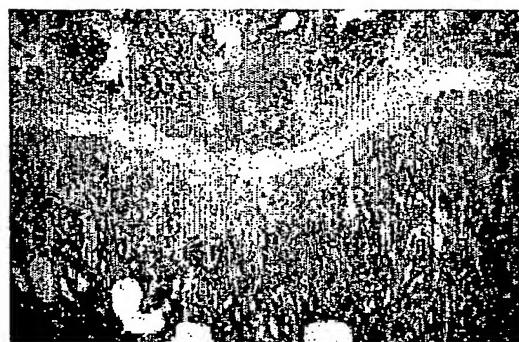


(b)

【도 10】

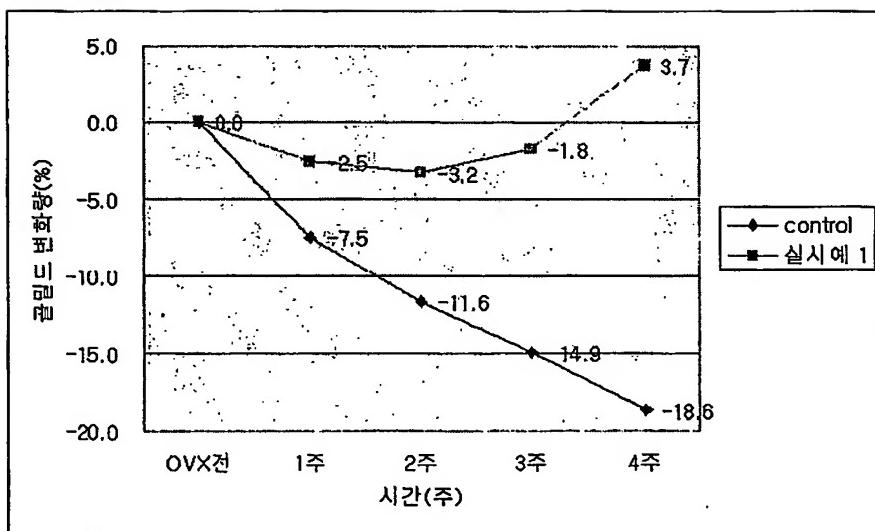


(a)

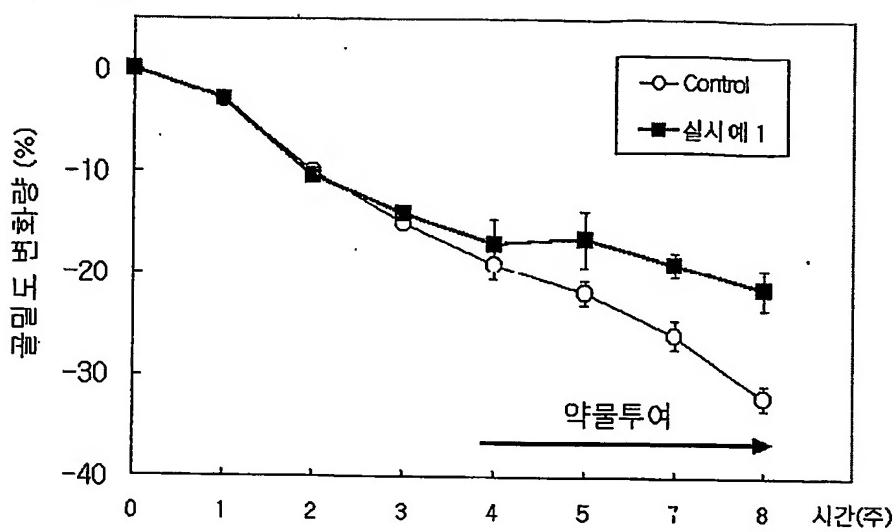


(b)

【도 11】



【도 12】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.